

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 12 月 20 日(20.12.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/173015 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/064471
- (22) 国際出願日: 2012 年 6 月 5 日(05.06.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-133285 2011 年 6 月 15 日(15.06.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京大学(The University of Tokyo) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP). 日本碍子株式会社(NGK INSULATORS, LTD.) [JP/JP]; 〒4678530 愛知県名古屋市中村区瑞穂区須田町 2 番 5 6 号 Aichi (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 陶山 明(SUYAMA Akira) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 廣田 寿一(HIROTA Toshikazu) [JP/JP]; 〒4678530 愛知県名古屋市中村区瑞穂区須田町 2 番 5 6 号 日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 丹羽 孝介(NIWA Kousuke) [JP/JP]; 〒4678530 愛知県名古屋市中村区瑞穂区須田町 2 番 5 6 号 日本碍子株式会社内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 快友国際特許事務所(KAI-U PATENT LAW FIRM); 〒4500002 愛知県名古屋市中村区名駅二丁目 4 番 1 4 号 日石名駅ビル 7 階 Aichi (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,

[続葉有]

(54) Title: PROBE SET AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: プローブセット及びその利用

AA	BB	AA	BB
配列の種類	配列(5'→3')	配列の種類	配列(5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG
D1-002	TGGAACCTGGGAACGCTTTAGATG	D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCOCT
D1-003	TTGCGCTTCGTTGTAATTTGCGAC	D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA
D1-005	TAGCCCAAGTGATTATGACATGC	D1-044	GAGTCGCGCAAAATATAGGAGGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGAGGTT	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
D1-008	TTGCGTTGTCGATATGAGGATCT	D1-049	CGCGTCGAATTACTTAATCACCA
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC	D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAAATACGCTAGA	D1-051	CGCCATTATACAACGGTTCTATGC
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG	D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAATG	D1-053	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCATG	D1-062	CTAGCACAAATTAATCAATCCGCC
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA	D1-063	GCAGCTGAATTGCTATGATCACC
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	D1-064	GCCTATAGTGTGATTTGCTCTCG
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	D1-065	CGATCAGGATTAATGTCACCCCG
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	D1-067	TTTGTGTTGATATATCAGGGGTG
D1-024	CCGTCGTTGTTAATAAGACCCCT	D1-074	CGATCAGCTCTAATTCCTCCCA
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	D1-077	CGCAGTTTGCAAGAAGCAACAAA
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT	D1-079	GGGGTGTGAGAGCTTTTATAGCG
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATGCGAT	D1-081	ACCACTATGATTGAGGAACGCG
D1-029	CGCGATTCTTATTGATTGATGCC	D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA
D1-030	CCGTCTGGGTAAAGATTGCTAG	D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC
D1-032	CGCCTAAATGAAACTCACTCTGC	D1-090	ATGCCAATATGTACTCGTGACTC
D1-033	GGGGTCAACCAACAATTGATCT	D1-094	CTAGGTACAACCAACTGTCTC
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGATTATGGT	D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG
D1-036	TGCCGGCTATCGTAAGTATATGC	D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGGTA
D1-037	GCACCTCATACCTTCATAGAGCA	D1-100	TGCAGTGAAGCAACTATTGTCT

AA Type of sequence
BB Sequence (5' → 3')

(57) Abstract: The disclosure of this specification provides a probe set having superior analysis performance. The disclosure of this specification is a probe set comprising one or more types of probes each having one or more types of base sequences selected from the group consisting of the base sequences listed in the table, and complementary sequences thereof.

(57) 要約: 本明細書の開示は、より分析性能に優れたプローブセットを提供する。本明細書の開示は、以下の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の塩基配列をそれぞれ有する 1 種又は 2 種以上のプローブからなるプローブセットとする。

WO 2012/173015 A1



LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロ
シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロ
ッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：プローブセット及びその利用

技術分野

[0001] 本願は、日本国特許出願特願 2011-133285 に基づく優先権を主張する出願であって、その全内容が引用により本明細書に組み込まれる。

[0002] 本明細書は、プローブセット及びその利用に関する。

背景技術

[0003] 微生物などの特定生物の検出あるいは同定のほか、相同遺伝子の探索、塩基配列の決定、遺伝子の変異や多型の検出などに、プローブハイブリダイゼーション技術が多用されている。プローブハイブリダイゼーション技術は、生物起源の DNA などのポリヌクレオチドにおける特定の塩基配列（以下、標的配列ともいう。）を、オリゴヌクレオチドプローブを用い、塩基対を形成させるハイブリダイゼーションによって検出する技術である。プローブハイブリダイゼーションにおいては、複数のプローブを固定化したアレイが用いられることが多い。

[0004] アレイには、従来、標的配列に相補的な塩基配列を有するプローブが固定化されている。こうしたアレイでは、一般に、プローブと生物起源の DNA 試料とのハイブリダイゼーションには、サンプルの種類や固定化されたプローブの長さ、塩基配列や形態（1 本鎖又は 2 本鎖）によっても異なるが、概ね数時間から 48 時間程度を要するとされている（非特許文献 1）。

[0005] また、融解温度（ T_m ）を一定温度範囲内とし、安定な二次構造を形成せず、しかも、相補的な配列と高度に特異的にハイブリダイゼーションするように選択された人工的な 100 個の塩基配列を決定し、この塩基配列を有するユニバーサルプローブを固定化したユニバーサルアレイを用いる方法も報告されている（非特許文献 1、特許文献 1）。この方法では、DNA 試料から、アレイ上のプローブ中の特定塩基配列と関連付けた識別配列を有するハイブリダイゼーション用サンプルをリガーゼ反応等を用いた連結分子として

予め調製しておく。こうしたサンプルを、ユニバーサルアレイに適用すれば、サンプル中の識別配列が予め関連付けられたプローブとハイブリダイゼーションすることになる。ユニバーサルプローブでは、塩基配列の多様性が低減されていることなどから、ハイブリダイゼーション時間は1時間程度でも可能となっている。また、融解温度をなるべく近接させたプローブを用いることがより一層好ましいことも記載されている（特許文献1）。

[0006] さらに、こうした100種の塩基配列を有する100のプローブのうち一部のプローブについてハイブリダイゼーション率（速度）について検討されている（非特許文献2）。この文献には、プローブ末端に二次構造を形成しないプローブが、そうでないプローブよりもハイブリダイゼーション促進能が高いことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2008-306941号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：DNAチップ応用技術：第5章DNAマイクロアレイの実際とその応用、第43頁～54頁、2000年8月発行、株式会社シーエムシー出版

非特許文献2：Analytical Biochemistry, 364, 1, 2007, 78-85

非特許文献3：Proceedings of the 13th international conference on DNA computing, pp.119-129, 2008, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

発明の概要

[0009] 従来一般的なプローブを用いたハイブリダイゼーションにおいては、プローブの塩基配列は標的配列に応じて決定されるため、プローブの配列を検討してハイブリダイゼーション時間を短縮するという試み自体が困難である。したがって、従来のプローブハイブリダイゼーションにおいては、こうした試みは具体的になされていない。

[0010] 一方で、検出や診断についての迅速性の要請を考慮すると、ハイブリダイ

ゼーション時間のさらなる短縮が望まれている。

[0011] ユニバーサルプローブを用いたハイブリダイゼーションにおいては、既に1時間というハイブリダイゼーション時間が達成されており、従来技術に比べて著しい改善がなされている。しかしながら、これらのユニバーサルプローブについてのさらなる改善について未だ報告はされていない。

[0012] また、本発明者らの検討によれば、二次構造を形成しにくくかつ T_m が均質に設計されたユニバーサルプローブであっても、ハイブリダイゼーション速度の観点からみると相当程度大きな差があることがわかった。

[0013] そこで、本明細書は、より分析性能に優れたプローブセット及びその利用を提供する。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、プローブのハイブリダイゼーション速度について種々検討したところ、実際のハイブリダイゼーションにおいては、予想を超えたハイブリダイゼーション速度の相違があるという知見を得た。さらに、ハイブリダイゼーション速度に基づいてプローブを選択することで従来では想定しえなかった程度のハイブリダイゼーション時間での分析を実現できることを見出し、本発明を完成した。また、ハイブリダイゼーション速度がそろったプローブを用いることで定量応答性の優れた分析を実現できることがわかった。本明細書は以下の手段を提供する。

[0015] (1) 以下の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列をそれぞれ有する1種又は2種以上のプローブからなる、プローブセット。

[表1]

配列の種類	配列(5'→3')	配列の種類	配列(5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG
D1-002	TGGAAC TGGAAACGCTTTAGATG	D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCGT
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTCGGAC	D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA
D1-005	TAGCCCACTGATTTATGACATGC	D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
D1-008	TTCGGTTGTCGATATGAGGATCT	D1-049	CGCGTCGAATTACTTAATCACCA
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC	D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAAATACCCTAGA	D1-051	CGCCATTATACAACGGTTCATGC
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG	D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG	D1-053	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG	D1-062	CTAGCACAAATTAATCAATCCGCC
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA	D1-063	GCAGCTGAATTGCTATGATCACC
D1-016	AGGTCCGTTAGTAATTTAGGTGC	D1-064	GCCTATAGTGTGATTGTCCTCG
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	D1-067	TTGTTGTTGATATCAGGCGTG
D1-024	CCGTCTGTTTATTAAGACCCCT	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCCA
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA
D1-026	GATTTGTCAGGTACAGTCCACTT	D1-079	GGGGTGTGAGAGCTTTTAGACG
D1-027	GCCACACTCTTACTTATCGACT	D1-081	ACCACTATGATTGAGGAAACGCG
D1-029	CGCGATTCCATTGATTGATCCC	D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA
D1-030	CCGTCTGGGTTAAGATTGCTAG	D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC
D1-032	CGCCTAAATGAACTCACTCTGC	D1-090	ATGCCAATATGTACTCGTGACTC
D1-033	GGGGTCAAACCAACAATTGATCT	D1-094	CTAGGTACAACACCAACTGTCTC
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG
D1-036	TGCCGGCTATCGTAAGTATATGC	D1-097	CGCCGTACTATTAGAAAGGGCTA
D1-037	GCACCTCATACCTTCATAGAGCA	D1-100	TGCAGTGAAGCAACTATTGTCT

(2) 以下の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列をそれぞれ有する1種又は2種以上のプローブからなる、(1)に記載のプローブセット。

[表2]

	配列の種類	配列 (5'→3')
1	D1-001	tggtctctga ccaatgaatc tgc
2	D1-002	tggaactggg aacgcttag atg
3	D1-003	ttcgcttcgt tgaatttcg gac
4	D1-005	tagcccagtg atttatgaca tgc
5	D1-006	cgctctggtt actattggac gtt
6	D1-010	gagtagcagg caaataccct aga
7	D1-014	tgctcactta cattacgtcc atg
8	D1-016	aggtccggtg gtaatttagg tgc
9	D1-020	tattctacca acgacatcac tgc
10	D1-023	catctccaag aattgaccca cca
11	D1-025	gaaggatcgc tttatctgg cat
12	D1-026	catttgctag gtacagtcca ctt
13	D1-027	gcccacactc ttacttatcg act
14	D1-030	ccgtctgggt taaagattgc tag
15	D1-035	atgccgttgt caagagtat ggt
16	D1-038	cgcgacattt agtcaggag atg
17	D1-040	agacaattag aatcagtgcc cct
18	D1-041	gcattgaggt attgtgctc cca
19	D1-044	gagtccgcaa aaatatagga ggc
20	D1-045	gcctcacata actggagaaa cct
21	D1-052	gcctatatga accaagccac tgc
22	D1-062	ctagcacaat taatcaatcc gcc
23	D1-064	gcctatagtg tcgattgtcc tcg
24	D1-065	cgatcacgga ttaatgtcac ccc
25	D1-074	cgatcagctc tatttcctc cca
26	D1-077	cgcagttgc aagaacgaac aaa
27	D1-079	ggggtgtgag agcttttag acg
28	D1-084	ccgtgtgtat gagtatgaca gca
29	D1-089	gagtcgaaga cctcctcta ctc
30	D1-090	atccaatat gtactcgtga ctc
31	D1-095	tgccggttat accttaagg acg
32	D1-097	cgcggtacta ttagaaaggg cta
33	D1-100	tgagtgtaa gcaactattg tot

(3) 以下の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列をそれぞれ有する1種又は2種以上のプローブからなる、(1)又は(2)に記載のプローブセット。

[表3]

	配列の種類	配列 (5'→3')
1	D1-001	tggtctctga ccaatgaatc tgc
2	D1-002	tggaactggg aacgcttttag atg
3	D1-003	ttcgcttcgt tgaatttcg gac
4	D1-005	tagcccagtg atttatgaca tgc
5	D1-016	aggtccggta gtaatttagg tgc
6	D1-020	tattctacca acgacatcac tgc
7	D1-023	catctccaag aattgaccca cca
8	D1-025	gaaggatcgc ttttatctgg cat
9	D1-030	ccgtctgggt taaagattgc tag
10	D1-035	atgccgttgt caagagttat ggt
11	D1-040	agacaattag aatcagtgcc cct
12	D1-041	gcattgaggt attgttgctc cca
13	D1-044	gagtcgcaa aaatatagga ggc
14	D1-045	gcctcacata actggagaaa cct
15	D1-062	ctagcacaat taatcaatcc gcc
16	D1-064	gcctatagtg tcgattgtcc tcg
17	D1-065	cgatcacgga ttaatgtcac ccc
18	D1-074	cgatcagctc tattccctc cca
19	D1-084	ccgtgtgtat gagtatgaca gca
20	D1-089	gagtcgaaga cctcctccta ctc
21	D1-097	cgcggtacta ttagaaaggg cta

(4) (1) に記載の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される 10 種以上の塩基配列を有する 10 種以上のプローブからなる、

(3) に記載のプローブセット。

(5) 少なくとも以下の表に記載の塩基配列又は相補配列を有するプローブを含む、(4) に記載のプローブセット。

[表4]

	配列の種類	配列 (5'→3')
1	D1-002	TGGAAC TGGGAACGCTTTAGATG
2	D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
3	D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC
4	D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
5	D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
6	D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT
7	D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCT
8	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
9	D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC
10	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCCA

(6) (1) ~ (5) のいずれかに記載のプローブセットが担体に固定化されたアレイ。

(7) (1) ~ (5) のいずれかに記載のプローブセットを用いてハイブリダイゼーションを実施するハイブリダイゼーション工程と、

前記ハイブリダイゼーション工程のハイブリダイズ産物を検出する検出工程と、

を備える、プローブセットの使用方法。

(8) プローブのスクリーニング方法であって、

融解温度が57℃以上61℃以下であり、23塩基長の正規直交配列である塩基配列を有するプローブについて、前記塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションを実施するハイブリダイゼーション工程と、

前記ハイブリダイゼーション工程において、所定時間内におけるハイブリッド形成率が所定数値以上のプローブを選択する工程と、

を備える、スクリーニング方法。

(9) プローブのスクリーニング方法であって、

融解温度が57℃以上61℃以下であり、23塩基長の正規直交配列である塩基配列を有するプローブについて、前記塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションを実施するハイブリダイゼーション工程と、

前記ハイブリダイゼーション工程において、所定時間内におけるハイブリッド形成率が所定数値範囲内のプローブを選択する工程と、

を備える、スクリーニング方法。

(10) プローブセットであって、

以下の(a)及び(b)を充足する、プローブからなる、セット。

(a) 融解温度が57℃以上61℃以下であり、23塩基長の正規直交配列である塩基配列を有する。

(b) ハイブリダイゼーション開始後3600秒後におけるハイブリッド形成率に対する

ハイブリダイゼーション開始後15秒後のハイブリッド形成率が50%以上

である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]実施例における第1のプローブセットを固定化したDNAマイクロアレイにおけるサンプルDNAとのハイブリダイゼーションにおけるハイブリッド形成率を評価した結果を表として示す図である。

[図2]実施例における第1のプローブセットを固定化したDNAマイクロアレイにおけるサンプルDNAとのハイブリダイゼーションにおけるハイブリッド形成率を評価した結果を表として示す図である。

[図3]実施例における第1のプローブセットを固定化したDNAマイクロアレイにおけるサンプルDNAとのハイブリダイゼーションにおけるハイブリッド形成率を評価した結果を示す図である。

[図4]実施例における第2のプローブセットを固定化したDNAマイクロアレイにおけるサンプルDNAとのハイブリダイゼーションにおけるハイブリッド形成率を評価した結果を表として示す図である。

[図5]実施例における第2のプローブセットを固定化したDNAマイクロアレイにおけるサンプルDNAとのハイブリダイゼーションにおけるハイブリッド形成率を評価した結果を示す図である。

[図6]実施例における第3のプローブセットを固定化したDNAマイクロアレイにおけるサンプルDNAとのハイブリダイゼーションにおけるハイブリッド形成率を評価した結果を表として示す図である。

[図7]実施例における第3のプローブセットを固定化したDNAマイクロアレイにおけるサンプルDNAとのハイブリダイゼーションにおけるハイブリッド形成率を評価した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] 本明細書は、ハイブリダイゼーションを短縮できるプローブセット及びその利用に関する。本明細書に開示されるプローブセットによれば、予想を超えて迅速なハイブリダイゼーションを達成し、極めて短時間でも検出精度を確保し信頼性に足るレベルでの標的配列の検出が可能となっている。こうし

た迅速な検出が可能となることにより、プローブハイブリダイゼーションの一層の適用拡大が可能となる。

[0018] また、本プローブセットによれば、ハイブリダイゼーション速度が近似しているので、定量応答性が良好なハイブリダイゼーションを達成できる。こうした定量的な検出が可能となることにより、プローブハイブリダイゼーションの一層の適用拡大が可能となる。

[0019] 以下では、本発明の代表的かつ非限定的な具体例について、図面を参照して詳細に説明する。この詳細な説明は、本発明の好ましい例を実施するための詳細を当業者に示すことを単純に意図しており、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。また、以下に開示される追加的な特徴ならびに発明は、さらに改善されたプローブセット及びその利用を提供するために、他の特徴や発明とは別に、又は共に用いることができる。

[0020] また、以下の詳細な説明で開示される特徴や工程の組み合わせは、最も広い意味において本発明を実施する際に必須のものではなく、特に本発明の代表的な具体例を説明するためにのみ記載されるものである。さらに、上記及び下記の代表的な具体例の様々な特徴、ならびに、独立及び従属クレームに記載されるものの様々な特徴は、本発明の追加的かつ有用な実施形態を提供するにあたって、ここに記載される具体例のとおり、あるいは列挙された順番のとおり組み合わせなければならないものではない。

[0021] 本明細書及び／又はクレームに記載された全ての特徴は、実施例及び／又はクレームに記載された特徴の構成とは別に、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、個別に、かつ互いに独立して開示されることを意図するものである。さらに、全ての数値範囲及びグループ又は集団に関する記載は、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、それらの中間の構成を開示する意図を持ってなされている。

[0022] 以下、本明細書の開示の各種実施形態について説明する。

[0023] (プローブセット)

本プローブセットは、表5に示す特定の塩基配列(配列番号1～100)又はその相補配列(配列番号101～200)から一定条件を充足するように選抜された塩基配列の群から選択される塩基配列を有するプローブセットである。

[0024] [表5]

配列の種類	配列(5'→3')	配列の種類	配列(5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	D1-051	CGCCATTATACAACGGTTCATGC
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG	D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC
D1-003	TTGCTTCGTTGTAATTCGGAC	D1-053	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG
D1-004	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT	D1-054	GTCGGTATCGAAAAGGTAAGTCA
D1-005	TAGCCAGTGATTTATGACATGC	D1-055	AGGCAGTTCAACCTATATCTGCG
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGACGTT	D1-056	GGTCGTAACATTGAGAGGAGACG
D1-007	TAGCCAACTCTAAATAACGGACG	D1-057	GGCGATTTATTGCTAACTGGCTA
D1-008	TTGCGTTGTCGATATGAGGATCT	D1-058	GCCTACCGCTAACTATACGCTA
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC	D1-059	GGCTCGTAGTACTCCTTACATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAATACCGTAGA	D1-060	GGCTCTACAACTTGTGTCCATG
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG	D1-061	GGTGGAGTGAATCTCACTAGACT
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAATG	D1-062	CTAGCACAATTAATCAATCCGCC
D1-013	CATTCGACATAAGCTGTTGATGC	D1-063	GCAGCTGAATTGCTATGATCACC
D1-014	TGCTCAGTTACATTACGTCCATG	D1-064	GCCTATAGTGTGCTGTTGCTCG
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA	D1-065	CGATCACGGATTAAATGTCACCCC
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	D1-066	AAGAGATTTAACTTGAGCTCGCC
D1-017	TGCACTCTGATATATACAGGCCA	D1-067	TTTGTGTTTCGATATCAGGCGTG
D1-018	GCAGCCCTTATAGATAACGGGAC	D1-068	GCCCGGGAATGATTATAACGCA
D1-019	GAAGCCATGATACTGTTCAAGGT	D1-069	GCATTTTGAATATCCGAGCGCC
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	D1-070	CATGGATAAGTTTCAAGCTGCG
D1-021	CCATCAGTTATTCGGAGGGAAGC	D1-071	GAGACAGGTAAACCCCTCAGAGCA
D1-022	CCATATCCGATTATTAGCGACGG	D1-072	TAGCACCCGTAAACCGGAAATG
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	D1-073	TATGTTTAGTTGTTGAACCGGCG
D1-024	CCGTCGTGTTATTAAGACCCCT	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCTCCCA
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	D1-075	AGTCAGTTAATCAGACGTGAGCA
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT	D1-076	TGGCAATACAATAACGTATCGCG
D1-027	GCCCACTCTTACTTATCGACT	D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGACAAA
D1-028	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG	D1-078	CGCGATAATTGATACCTACGGGC
D1-029	CGCGATTCCTATTGATTGATCCC	D1-079	GGGGTGTGAGAGCTTTTATAGCG
D1-030	CCGTCTGGGTAAAGATTGCTAG	D1-080	GGGATCCGTAACAAGTGTGTTAG
D1-031	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG	D1-081	ACCACTATGATTGAGGAACGCG
D1-032	CGCCTAAATGAACTCACTCTGC	D1-082	CGTCTTTAGTATCAACCTCCGC
D1-033	GGGGTCAAACCAACAATTGATCT	D1-083	GCATACGAACCTCTATATCGCG
D1-034	GCCCATTGATAGAATTACGAGGC	D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	D1-085	TGCTGTCTTCGTGTTTACCTAG
D1-036	TGCCGGCTATCGTAAGTATATGC	D1-086	CGATCATGTAAAGCTAACTCGCG
D1-037	GCACCTCATACCTTCATAGAGCA	D1-087	TGCCGTCATTTAAACGTAAGGGT
D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG	D1-088	TGGCAATTACAGTTGTTAACGCA
D1-039	CTAGTCCATTGTAACGAAGGCCA	D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC
D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCT	D1-090	ATGCCAATATGTAAGTCTGACTC
D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA	D1-091	GCATATAGTGACGGTAAGGCGAA
D1-042	CGAGAGTCTGTAATAGCCGATGC	D1-092	GCCTCACTTGAATAAGCGGGAC
D1-043	TGCCGTGATACTTAACTACGCTA	D1-093	GTCCCAAAAGCTTCTTACGGACG
D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC	D1-094	CTAGGTACAAACCAACTGTCTC
D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT	D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG
D1-046	CGCCAATGACAATAAGTTGAGGC	D1-096	GGCTGGTTAAATGTAATCCGCG
D1-047	CGCGATATAACATTAACCGAGGC	D1-097	CGCGGTAATTAGAAAGGGCTA
D1-048	CACGCTTAGTTCTACCTTAGGC	D1-098	AGTCGTTAATTACTCCGGATGG
D1-049	CGCGTCGAATTACTTAATCACCA	D1-099	CGCTGTTGGTATTACCTTCCTCG
D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC	D1-100	TGCAGTGTAAGCAACTATTGTCT

[0025] 表5に記載する塩基配列は、正規直交配列ともいい、たとえば乱数から得られた所定塩基長のDNA配列に対して連続一致長、Nearest-Neighbor法による融解温度予測、ハミング距離、二次構造予測の計算を行うことにより設計される。正規直交配列は、核酸の塩基配列であって、その融解温度が均一であるもの、即ち融解温度が一定範囲内に揃うように設計された配列であって、核酸自身が分子内 (intramolecular) で構造化して、相補的な配列とのハイブリッド形成を阻害することのない配列であり、尚且つこれに相補的な塩基配列以外とは安定したハイブリッドを形成しない塩基配列を意味する。

1つの正規直交配列群に含まれる配列は、所望の組み合わせ以外の配列間および自己配列内において反応が生じ難いか、または反応が生じない。また、正規直交配列は、PCRにおいて増幅させると、たとえば上述のクロスハイブリダイズのような問題に影響されずに、当該正規直交配列を有する核酸の初期量に応じた量の核酸が定量的に増幅される性質を有している。上記のような正規直交配列は、H.Yoshida and A.Suyama, "Solution to 3-SAT by breadth first search", DIMACS VL 54, 9-20(2000)に記載された情報に基づいて設計された。なお、表5における各欄の左欄における三桁の数字は、配列番号に対応している。すなわち、表5中の001-001~100で特定される塩基配列は、配列番号1~100に対応している。また、配列番号1~100で表される塩基配列と相補的な塩基配列が配列番号101~200で表される。

[0026] なお、表5の塩基配列の融解温度は、57℃以上61℃以下の範囲内となっている。なかでも、融解温度は好ましくは、58℃以上60℃以下であり、より好ましくは約59℃である。融解温度は、Nearest-neighbor法を用い、0.1 μ Mのプローブ濃度で、50 mM Na^+ , 1.5 mM Mg^{2+} の条件で測定することができる。なお、本発明において用いられうる正規直交配列の融解温度は、上記温度に限定されるものではなく、一定範囲内、好ましくは目標とする融解温度の $\pm 2^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $\pm 1^\circ\text{C}$ の範囲内の一定範囲

に設定することができる。

[0027] また、表5の塩基配列はいずれも23塩基長であるが、本発明において用いられうる正規直交配列の塩基長は23塩基長に限定するものではない。必要に応じてより少ないあるいはより多い塩基長の正規直交配列が設計される。

[0028] 本プローブセットは、以下の表6に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列をそれぞれ有する1種又は2種以上のプローブからなることができる。以下の説明において、プローブセットに含まれるプローブが有する塩基配列は、以下の表等において具体的に表される塩基配列かあるいはその相補配列のいずれかである。一つのプローブセットにおいて、一つのプローブが表等において具体的に表される一つの塩基配列を有するとき、他のプローブは、他の具体的に表される塩基配列を有し、その相補配列を有していないことが好ましい。

[0029] [表6]

配列の種類	配列 (5'→3')	900秒時における評価	配列の種類	配列 (5'→3')	900秒時における評価
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	AAA	D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG	AAA
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG	AAA	D1-040	AGACAATTAGAAATCAGTGCCCT	AAA
D1-003	TTCCGTTTGGTTGTAATTTCCGAC	AAA	D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA	AAA
D1-005	TAGCCGAGTGATTATGACATGC	AAA	D1-044	GAGTCCGCAAAATATAGGAGGC	AAA
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	AAA	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT	AAA
D1-008	TTCCGTTGTCGATATGAGGATCT	A	D1-049	CGCGTCGAATTACTTAATCACC	AAA
D1-009	GGGGGCTACTTCATACAAGATGC	AA	D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC	AAA
D1-010	GAGTAGCAGGCAATACCCCTAGA	AAA	D1-051	CGCCATTATACACGGTTCAATGC	AAA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTAGCTCATCG	AAA	D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC	AAA
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAATG	AAA	D1-053	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG	AAA
D1-014	TGCTCACCTACATTACGTCCATG	AAA	D1-062	CTAGCACAAATTAATCAATCCGCC	AAA
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA	AAA	D1-063	GCAGCTGAATTGCTATGATCACC	AAA
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	AAA	D1-064	GCCTATAGTGTGATTTGCTCTCG	AAA
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	AAA	D1-065	CGATCAGGATTAATGTCAACCC	AAA
D1-023	CATCTCCAAGAAATTGACGCACCA	AAA	D1-067	TTTGTGTTGCTGATATCAGGCGTG	A
D1-024	CCGTGCTGTTTATTAAGACCCCT	AAA	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCCA	AAA
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATGTGGCAT	AAA	D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA	A
D1-026	CATTGTGTCAGGTACAGTCCACTT	AA	D1-079	GGGGTGTGAGAGCTTTTAGAGG	AA
D1-027	GCCGACACTCTTACTTATCGACT	AA	D1-081	ACCAGTATGATTGAGGAACGCG	AA
D1-029	CGCGATTCTTATTTGATGCTCC	A	D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA	AAA
D1-030	CGGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG	AAA	D1-089	GAGTCGAAGACGTCCTCCTACTC	AAA
D1-032	CGCCTAAATGAACTCACTCTGC	AAA	D1-090	ATGCCAATATGTACTGCTGACTG	AAA
D1-033	GGGGTCAAAACCAAAATTTGATCT	AAA	D1-094	CTAGGTACAACCACTTGTCTCTC	AA
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	AAA	D1-095	TGCCGTTATACCTTTAAGGACG	AA
D1-036	TGCCGGCTATCGTAAGTATATGC	A	D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA	AA
D1-037	GCACCTGATACCTTCATAGAGCA	A	D1-100	TGCAGTGTAAAGCAACTATTGTCT	AAA

[0030] 表6に示す塩基配列を有するプローブは、ハイブリダイゼーション速度に基づいて選択されている。すなわち、これらのプローブは、3600秒（1

時間)のハイブリダイゼーションにおけるハイブリッド形成率(蛍光強度)に対してハイブリダイゼーション開始後15秒以内にハイブリッド形成率が50%以上となることができるプローブである。

[0031] また、こうしたプローブは、ハイブリダイゼーション開始後900秒以内に対3600秒時のハイブリッド形成率が85%以上(表6中Aを付記して示す。)、好ましくは90%以上(表6中AAを付記して示す。)であり、より好ましくは95%以上(表6中AAAを付記して示す。)に到達することができる。

[0032] また、表6に示す塩基配列を有するプローブのうち、さらに、ハイブリダイゼーション開始から一定時間後(例えば、15秒後、30秒後、60秒後、120秒後、240秒後及び900秒後等)における対3600秒時のハイブリッド形成率が一定範囲内にあるプローブが選択されることが好ましい。例えば、前記ハイブリッド形成率の差が20%以内であることが好ましく、より好ましくは15%以内であり、さらに好ましくは10%以内であり、一層このましくは5%以内であるプローブが選択されることが好ましい。こうしたプローブからなるプローブセットであれば、迅速でかつ定量性に優れたハイブリダイゼーションが可能となる。

[0033] 本プローブセットは、好ましくは以下の表に記載の塩基配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列を有するプローブからなる。これらのプローブは、ハイブリダイゼーション開始後15秒以内に対3600秒時のハイブリッド形成率が65%以上となるプローブである。こうしたプローブによればより迅速にかつ精度の高いハイブリッド形成を検出することができる。これらのプローブにおいても、上述のとおり、ハイブリダイゼーション開始から一定時間後(例えば、15秒後、30秒後、60秒後、120秒後、240秒後及び900秒後等)における対3600秒時のハイブリッド形成率が一定範囲内にあるプローブが選択されることが好ましい。

[0034] 本プローブセットは、より好ましくは、以下の表7に記載の塩基配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列を有するプローブからな

る。

[0035] [表7]

	配列の種類	配列(5'→3')
1	D1-001	tgttctctga ccaatgaatc tgc
2	D1-002	tggaactggg aacgcttttag atg
3	D1-003	ttcgcttcgt tgtaatttcg gac
4	D1-005	tagcccagtg atttatgaca tgc
5	D1-006	cgctctggtt actattggac gtt
6	D1-010	gagtagcagg caaataccct aga
7	D1-014	tgctcactta cattacgtcc atg
8	D1-016	aggtccggtg gtaatttagg tgc
9	D1-020	tattctacca acgacatcac tgc
10	D1-023	catctccaag aattgaccca cca
11	D1-025	gaaggatcgc ttttatctgg cat
12	D1-026	catttgcag gtacagtcca ctt
13	D1-027	gccacactc ttacttatcg act
14	D1-030	ccgtctgggt taaagattgc tag
15	D1-035	atgccgttgt caagagttat ggt
16	D1-038	cgcgacattt agtccaggag atg
17	D1-040	agacaattag aatcagtgcc cct
18	D1-041	gcattgaggt attgttgctc cca
19	D1-044	gagtccgcaa aaatatagga ggc
20	D1-045	gcctcacata actggagaaa cct
21	D1-052	gcctatatga accaagccac tgc
22	D1-062	ctagcacaaat taatcaatcc gcc
23	D1-064	gcctatagtg tcgattgtcc tcg
24	D1-065	cgatcacgga ttaatgtcac ccc
25	D1-074	cgatcagctc tatttcctc cca
26	D1-077	cgcagtttgc aagaacgaac aaa
27	D1-079	ggggtgtgag agcttttttag acg
28	D1-084	ccgtgtgtat gagtatgaca gca
29	D1-089	gagtccaaga cctcctccta ctc
30	D1-090	atgccaatat gtactcgtga ctc
31	D1-095	tgccggttat acctttaagg acg
32	D1-097	cgcggtacta ttagaaggga cta
33	D1-100	tcagtgtaa gcaactattg tct

[0036] これらのプローブは、ハイブリダイゼーション開始後15秒以内に対3600秒時のハイブリッド形成率が70%以上となるプローブである。こうしたプローブによればより迅速にかつ精度の高いハイブリッド形成を検出することができる。これらのプローブにおいても、上述のとおり、ハイブリダイゼーション開始から一定時間後（例えば、15秒後、30秒後、60秒後、120秒後、240秒後及び900秒後等）における対3600秒時のハイブリッド形成率が一定範囲内にあるプローブが選択されることが好ましい。

[0037] 本プローブセットは、より好ましくは、以下の表8に記載の塩基配列から

なる群から選択される 1 種又は 2 種以上の塩基配列を有するプローブからなる。

[0038] [表8]

	配列の種類	配列 (5'→3')
1	D1-001	tggtctctga ccaatgaatc tgc
2	D1-002	tggaactggg aacgctttag atg
3	D1-003	ttcgcttcgt tgtaatttcg gac
4	D1-005	tagccacagt atttatgaca tgc
5	D1-016	aggtccggtg gtaatttagg tgc
6	D1-020	tattctacca acgacatcac tgc
7	D1-023	catctccaag aattgacca cca
8	D1-025	gaaggatcgc tttatctgg cat
9	D1-030	ccgtctgggt taaagattgc tag
10	D1-035	atgccgttgt caagagttat ggt
11	D1-040	agacaattag aatcagtgcc cct
12	D1-041	gcattgaggt attgtgtc cca
13	D1-044	gagtcgcaa aaatatagga ggc
14	D1-045	gcctcacata actggagaaa cct
15	D1-062	ctagcacaat taatcaatcc gcc
16	D1-064	gcctatagtg tcgattgtcc tcg
17	D1-065	cgatcacgga ttaatgtcac ccc
18	D1-074	cgatcagctc tattccctc cca
19	D1-084	ccgtgtgtat gagtatgaca gca
20	D1-089	gagtcgaaga cctcctccta ctc
21	D1-097	cgcggtacta ttagaaagg cta

[0039] これらのプローブは、ハイブリダイゼーション開始後 15 秒以内に対 3600 秒時のハイブリッド形成率が 75%以上となるプローブである。こうしたプローブによればより迅速にかつ精度の高いハイブリッド形成を検出することができる。これらのプローブにおいても、上述のとおり、ハイブリダイゼーション開始から一定時間後（例えば、15 秒後、30 秒後、60 秒後、120 秒後、240 秒後及び 900 秒後等）における対 3600 秒時のハイブリッド形成率が一定範囲内にあるプローブが選択されることが好ましい。

[0040] 本プローブセットを構成するプローブは、ハイブリダイゼーション開始後 15 秒以内に対 3600 秒時のハイブリッド形成率が 80%以上であることがより好ましく、同 85%以上であることがさらに好ましい。

[0041] 本プローブセットは、表 6 に示す塩基配列群から選択される 1 種又は 2 種以上の塩基配列を有するプローブからなるが、好ましくはさらに多種類のプローブからなる。例えば、より好ましくは、3 種類以上、4 種以上、6 種類

以上、８種類以上、１０種類以上、２０種類以上、さらには３０種類以上、最も好ましくは３３種類以上を含むことが好ましい。本プローブセットは、本プローブセットを構成するプローブと同等あるいはそれ以上のハイブリッド形成率を実現する他のプローブが含まれていてもよい。

[0042] 本プローブセットは、以下の表９に示す塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される１種又は２種以上の塩基配列を有する１種又は２種以上のプローブからなることが好ましい。好ましくは、これらの全てを少なくとも含むことが好ましい。これらのプローブは、いずれもハイブリダイゼーション開始後３０秒以内に対３６００秒時の８５％以上のハイブリッド形成率を有しており、さらには、ハイブリダイゼーション開始後３０秒以内に対３６００秒時の８８％以上のハイブリッド形成率を有している。

[0043] [表９]

	配列の種類	配列(5'→3')
1	D1-002	TGGAACCTGGGAACGCTTTAGATG
2	D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
3	D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC
4	D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
5	D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
6	D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT
7	D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCT
8	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
9	D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC
10	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCCA

[0044] なお、本プローブセットを構成するプローブを選択する際のハイブリダイゼーション条件としては、ハイブリダイゼーション液の組成は、１～１０×ＳＳＣ（クエン酸ナトリウム緩衝液；１×ＳＳＣ組成：０．１５ＭＮａＣｌ、１５ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ７．０）（好ましくは、１～２×ＳＳＣ）及び０．１～１．０％ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）（好ましくは、０．１～０．３％程度）の緩衝液等を用いてハイブリダイゼーション温度を２０℃～７０℃程度することが好ましい。必要に応じて、ＤＭなどのホルムアミドを１０～５０％添加することができる。さらに、ＥＤＴＡなどを１ｍＭ～１０ｍＭ（好ましくは２ｍＭ）添加することもできる。典型的には、以

下の組成とすることができる。

20×SSC	2.0 ml
10%SDS	0.8 ml
100%Formamide	12.0 ml
100 mM EDTA	0.8 ml
水	24.4 ml
	40.0 ml

[0045] なお、以上の実施形態によれば、本プローブセットは、以下の形態を採ることもできる。すなわち、以下の（a）及び（b）を充足する、プローブを含む、セットという形態を採ることができる。

（a）融解温度が57℃以上61℃以下であり、23塩基長の正規直交配列である塩基配列を有する。

（b）ハイブリダイゼーション開始後3600秒後におけるハイブリッド形成率に対する

ハイブリダイゼーション開始後15秒後のハイブリッド形成率が50%以上である。

なお、条件（b）については、本プローブセットを構成するプローブの各種形態を適用することができる。

[0046] 本プローブセットを構成するプローブは、上記塩基配列を有して、相補的な塩基配列を有する検出対象中のDNA等のポリヌクレオチドとハイブリダイゼーション可能であればよい。したがって、塩基配列を保持しうるものであればよく、塩基を有する骨格は特に限定しない。したがって、プローブは、DNA、ペプチド核酸、モルホリノ核酸、メチルフォスフォネート核酸およびS-オリゴ核酸などの各種人工合成核酸であってもよい。さらに、プローブは、1本鎖であっても2本鎖であってもよいが、担体に固定化される場合には、1本鎖とすることが好ましい。

[0047] プローブは、必要に応じて識別標識を備えることができる。識別標識とし

ては、従来公知の各種の識別標識を備えることができ、当業者であれば、適当な識別標識を選択して、本プローブセットのプローブに付与することができる。

[0048] プローブは、後述する担体に化学的にあるいは物理的吸着等によって固定化するための構造を備えることができる。プローブは、従来公知の各種の方法で固相担体表面に固定化することができる。こうした構造は、プローブハイブリダイゼーションの分野の当業者において周知であり、保持体等の種類に応じて当業者であれば適宜選択し、プローブを保持体に固定化することができる。また、プローブは、固定化のための構造部分に対する適当なリンカー配列を備えていてもよい。リンカー配列は、好ましくはプローブ間において同一塩基長で同一配列とする。

[0049] こうしたプローブセットは、検出対象中の特定の塩基配列を直接的に又は間接的に検出することができる。直接的に検出する場合としては、例えば、予め検出対象に対してプローブセットを付与しておき、プローブに含まれる特定の塩基配列を識別用塩基配列として用いて検出対象の識別に用いる場合が挙げられる。こうした場合の検出対象として、市場を流通する製品、部品（中間製品を含む）、水産物、農産物、銀行券等が挙げられる。検出対象に付与されているプローブセットを構成するプローブの識別用塩基配列を、これらに相補的な塩基配列を有する検出用のプローブセットで検出対象を同定することができる。この場合、検出対象に付与されるプローブセットが後述するアレイであることが好ましい。また、検出用のプローブセットは溶液サンプルであることが好ましい。

[0050] また、検出対象中の特定の塩基配列を間接的に検出する場合としては、検出対象が生物体の場合が挙げられる。この場合、非特許文献2及び特許文献1等の開示の方法が挙げられる。すなわち、生物体の標的配列をハイブリダイゼーション反応及びリガーゼ反応等を用いて、本プローブセットを構成するプローブの特定塩基配列に予め関連付けられた塩基配列（特定塩基配列と同一又は相補的な塩基配列）を有するようなりガーゼ産物を取得して、この

リガーゼ産物の標識体を本プローブセットに提供することで、検出対象中の標的配列を検出したり同定したりすることができる。この場合、本プローブセットとして、後述するアレイが用いられることが好ましい。

[0051] 本プローブセットは、溶液に溶解して溶液中のハイブリダイゼーション反応に用いることができるし、適当な担体に固定化された状態での固液反応としてのハイブリダイゼーション反応に用いることもできる。

[0052] (プローブのスクリーニング方法)

本発明によれば、以上のことから、プローブのスクリーニング方法も提供される。すなわち、本スクリーニング方法は、例えば、融解温度が57℃以上61℃以下であり、例えば塩基長が23塩基長の正規直交配列である塩基配列を有するプローブについて、前記塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションを実施するハイブリダイゼーション工程と、前記ハイブリダイゼーション工程において、所定時間内におけるハイブリッド形成率が所定数値以上のプローブを選択する工程と、を備えることができる。また、本スクリーニング方法は、例えば、融解温度が57℃以上61℃以下であり、例えば塩基長が23塩基長の正規直交配列である塩基配列を有するプローブに基づいて選択された塩基配列を有するプローブについて、前記塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションを実施するハイブリダイゼーション工程と、前記ハイブリダイゼーション工程において、所定時間内におけるハイブリッド形成率が所定数値範囲内のプローブを選択する工程と、を備えることができる。この方法によれば、ユニバーサルプローブとして分析能の高いプローブを効率的に選択することができる。

[0053] スクリーニング工程においてプローブの選択となるハイブリダイゼーション速度については、本プローブセットを構成するプローブについて適用される各種形態を適用することができる。

[0054] (プローブセットが固定化されたアレイ)

本明細書に開示されるアレイは、本プローブセットが担体に保持されてい

る。プローブセットは、物理的吸着又は化学結合によって担体に固定化され保持されている。担体は、通常のハイブリダイゼーションの条件に耐えうるものであれば特に制限されない。具体的には、核酸の固定及びハイブリダイゼーション等に用いる溶剤に不溶であり、かつ常温若しくはその付近の温度範囲内（例えば0～100℃）で固体又はゲル状であるものが挙げられる。

[0055] このような担体の材質としては、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミック等が挙げられる。上記プラスチックとして具体的には、紫外線照射により生体分子を固定化することができるものであれば特に制限されず、具体的には、熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂及び共重合体等が挙げられる。さらに具体的には、熱可塑性樹脂としては、アイオノマー（スチレン系、オレフィン系）、ポリノルボルネン、ポリアセタール、ポリアリレート、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエチレンオキサイド、ポリオキシメチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリパラメチルスチレン、ポリアリルアミン、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンサルファイド、ポリブタジエン、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリエーテルスルホン、ポリフェニレンスルフィド、ポリオキシベンゾイル、ポリオキシエチレン、酢酸セルロース、ポリジメチルシロキサン、ポリイソブチレン、セルローストリアセテート、ポリ-p-フェニレンテレフタラミド、ポリイソプレン、ポリアクリロニトリル、ポリメチルペンテン、塩素プラスチック（ポリ塩化ビニル、ポリ塩化エチレン、塩素化ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン）、フッ素プラスチック（テトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン）、ポリアミド（ナイロン6、ナイロン66）、ポリアミドイミド、ポリイミド（熱可塑性ポリイミド、ポリエーテルイミド）、ポリエチレンプラスチック（塩素化、高密度、低密度）、ポリビニルプラスチック（ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリパラビニルフェノール、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルブチラール、ポリビニルホルマール）、液晶ポリマー（ポリエス

テル系液晶高分子)、アクリレートプラスチック(アミノポリアクリルアミド、ポリアクリル酸メチル、ポリメチルメタクリレート、エチルポリメタクリレート、ブチルポリメタクリレート)、熱可塑性エラストマー(スチレン系、オレフィン系、ウレタン系、ポリエステル系、ポリアミド系、1, 2-ポリブタジエン系、塩化ビニル系、フッ素系、ポリアイオノマー系、塩素化ポリエチレン系、シリコン系)等が挙げられる。

[0056] また、熱硬化性樹脂としては、エポキシ、ポリキシレン、ポリグアナミン、ポリジアリルフタレート、ポリビニルエステル、ポリフェノール、不飽和ポリエステル、ポリフラン、ポリイミド、ポリウレタン、ポリマレイン酸、メラミン、ユリア、アルキド、ベンゾグアナミン、ポリシアナート、ポリイソシアナート等が挙げられる。

[0057] さらに、共重合体としては、イソブチレン無水マレイン酸共重合体、アクリロニトリルアクリレートスチレン共重合体、アクリロニトリルEPDMスチレン共重合体、アクリロニトリルスチレン共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ブタジエンスチレンメチルメタクリレート共重合体、エチレン塩化ビニル共重合体、エチレン酢酸ビニル共重合体、エチレン-エチルアクリレート共重合体、アクリロニトリル-ブタジエンスチレン共重合体、ポリエーテルエーテルケトン共重合体、フッ化エチレンポリプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレンパーフロロアルキルビニルエーテル共重合体、テトラフルオロエチレンエチレン共重合体等が挙げられる。

[0058] 上記の合成樹脂のうち、特に好ましいものとしては、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリフェノール、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリ塩化ビニル、アラミド等が挙げられる。

[0059] 無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。金属として具体的には、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石、パラマグネット等が挙げられる。天然高分子としては、ポリアミノ酸、セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸及びそれ

らの誘導体が挙げられる。セラミックとして具体的には、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。

[0060] 上記担体には、直接プローブが保持されていてもよいが、さらに、担体に対して固定化のための固定化相が付与されていてもよい。こうした固定化相としては、上記担体上に担持される限り、単に物理的な接着性を利用して担持されていてもよく、また、化学的に共有結合等を介して担持されていてもよい。また、上記固定化相は、必要に応じ、担体等上の全面において担持されても、また、その一部において担持されてもよい。固定化相としては、上記した担体等の材料として説明した材料の他、有機低分子が挙げられる。上記有機低分子として具体的には、カルボジイミド基含有化合物、イソシアネート基含有化合物、窒素イペリット基含有化合物、アルデヒド基含有化合物、アミノ基含有化合物等が挙げられる。

[0061] 固定化相は、担体上に皮膜として担持されることが好ましい。担体上に固定化相を皮膜で担持させる方法としては、スプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコータを用いたコーティング等の公知の方法を用いることができる。

[0062] 例えば、ガラス製担体の表面全体にカルボジイミド基（樹脂）を導入する方法については、まず、3-アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノ置換オルガノアルコキシシランを適当な溶媒に溶解して得られた溶液に70～80℃程度の温度条件下で担体等を概ね2～3時間程度浸漬した後、これを取り出して水洗し、さらに、100～120℃程度で約4～5時間加熱乾燥する。乾燥後、適当な溶媒中に浸し、カルボジイミド樹脂を加え30～170℃程度の温度条件下で12時間程度攪拌し、洗浄すればよい。また、上記3-アミノプロピルトリエトキシシランのアミノ基と窒素イペリット基の核酸結合基以外の官能基を適当な溶媒を用いて反応させ、ガラス製担体の表面に窒素イペリット基を導入することもできる。

[0063] また、ガラス製担体にアミノ基以外場合や、担体がガラス以外の材料からなる場合においても、上記担体の説明で挙げた各種材料表面に種々の官能基

を導入することは、従来より一般的に行われていることであり、その方法も公知であるので、このような公知の方法を用いて担体等の表面への官能基の導入を行うことができる。

[0064] さらに、上記で挙げたプラスチック製担体の中には、担体表面に既に上記のような官能基を有するものも有り、この場合には担体等表面に官能基を導入することなしに、これをそのまま担体等の製造に用いることも可能である。また、このようなプラスチック製担体等であってもさらに官能基を導入して上記担体等の製造に用いることも可能である。

[0065] また、上記担体や固定化相の材料に公知の光重合開始剤を混合することもできる。光重合開始剤を混合することによって、紫外線等の電磁波の照射による核酸の固定化の際の反応性が向上し得る。

[0066] (プローブセットの使用方法)

本プローブセットの使用方法は、本プローブセットを用いてハイブリダイゼーションを実施するハイブリダイゼーション工程と、前記ハイブリダイゼーション工程で得られたハイブリダイズ産物を検出する工程と、を備える、検出対象を検出する方法とすることができる。本プローブセットは、特異的ハイブリダイゼーションを迅速に実現できるため、迅速に検出対象を同定又は検出することができる。

[0067] 本明細書に開示される使用方法は、本プローブセットを用いる限り特に限定されない。本発明方法において、検出とは、検出対象に対して予め本プローブセット（識別用プローブセット）を提供しておき、検出対象を、プローブ（識別用プローブ）中の特定塩基配列（識別用塩基配列）で識別しておく。そして、こうした検出対象に対してこれらの検出用プローブセットのプローブの識別用塩基配列に相補的な塩基配列を有する検出用プローブセット（これも本プローブセットである。）とのハイブリダイゼーションを実施し、検出対象を同定することのほか、真贋、改変、劣化等を検出又は識別することを含んでいる。本方法は、検出対象の管理、監視、認証、同定、追跡等の方法としても利用できる。以下、まずこの実施形態について説明する。

[0068] 本使用方法は、ハイブリダイゼーション工程と、検出工程と、を備えることができる。

[0069] (ハイブリダイゼーション工程)

ハイブリダイゼーション工程は、検出対象に付与された識別用プローブセットと、このプローブに含まれる識別用塩基配列と相補的な塩基配列を有する1又は2以上の検出用プローブを含む検出用プローブセットとのハイブリダイゼーションを実施する工程とすることができる。ハイブリダイゼーション工程において、検出対象が予め関連付けられた識別用プローブを備えているとき、検出対象上の識別用プローブと検出用プローブとがハイブリダイズ産物を形成することができる。検出用プローブセットは、検出対象に予め付与した識別用塩基配列に対応するプローブだけを供給してもよいし、ユニバーサルに多くの検出対象に適用可能に組成したプローブを供給してもよい。

[0070] 検出用プローブは、標識されていることが好ましい。標識としては従来公知のものを適宜選択して用いることができる。それ自体励起されると蛍光シグナルを発する蛍光物質などの各種色素であってもよいし、さらに酵素反応や抗原抗体反応により第2成分と組み合わせて各種シグナルを発する物質であってもよい。典型的には、Cy 3、Alexa555、Cy 5、Alexa647等の蛍光標識物質を用いることができる。また、ビオチンとストレプトアビジンHPRとを組み合わせることで基質による処理等による発色による検出を用いてもよい。

[0071] ハイブリダイゼーション工程の条件は特に限定しない。通常、ハイブリダイズ媒体を用いることができる。また、適度な温度に設定することができる。本方法においては、ハイブリダイゼーション時間を15分以下とすることができる。また、好ましくは10分以下とすることもでき、さらに5分以下とすることもできる。

[0072] なお、ハイブリダイゼーション工程に際しては、アレイを検出対象から分離してもよい。分離可能な固定化手段によりアレイが検出対象に固定化されている場合には、検出対象とから分離した状態でハイブリダイゼーション工

程を実施できる。また、可能な場合には、検出対象上でハイブリダイゼーション工程を実施してもよい。例えば、本アレイ上に、ハイブリダイゼーション用のキャビティを備える場合が挙げられる。

[0073] 後段の検出工程に先立って、過剰のプローブを洗浄除去することが好ましい。識別用プローブは担体に固定化されているため、余分なプローブを洗浄しても、ハイブリダイズ産物は、担体上に保持される。

[0074] (検出工程)

検出工程は、ハイブリダイゼーション工程のハイブリダイズ産物を検出する工程とすることができる。ハイブリダイゼーション産物を検出することにより、検出対象を検出・同定できる。検出工程におけるハイブリダイズ産物の検出方法は特に限定されない。連結分子が標識を有する場合には、その標識を検出すればよい。また、電気的な検出方法などにより、二重鎖を検出してもよい。

[0075] ハイブリダイズ産物が検出されたとき、検出対象が識別、同定される。すなわち、検出対象の同一性が判定されるため、改ざんされていないこと、置換されていないこと、損なわれていないことなどが判定できる。また、ハイブリダイズ産物が検出されないとき、検出対象の不存在ないし検出対象の非同一と判定される。すなわち、検出対象は失われたか、改ざんされたか、損なわれたかなどと判定される。

[0076] 検出工程に要する時間は、特に限定しないが、1秒以上1時間以下とすることができる。本方法においては、例えば、特定の識別用塩基配列を用いるため、一般的な検出温度(50℃～70℃)と比べ40℃以下(例えば37℃程度)でハイブリダイズ及び検出が可能であるため、検出工程の迅速化も可能となっている。より好ましくは1秒以上5分以下であり、さらに好ましくは1秒以上1分以下である。

[0077] また、本明細書において検出とは、生物体の核酸等において存在する可能性のある塩基配列(標的配列)を、ハイブリダイゼーション反応とリガーゼ反応を用いて、本プローブセットのプローブに関連付けられた塩基配列(特

定塩基配列と同一又は相補的な塩基配列)を有するリガーゼ産物を媒介物として、本プローブセットとのハイブリダイゼーションを実施し、検出対象を検出することを含んでいる。この種の方法は、非特許文献2、特許文献1のほか、特開2009-232778号公報、特開2009-24号公報、を参照して実施することができる。

[0078] すなわち、例えば、特許文献1によれば、試料中の1種又は2種以上の標的核酸中の多型又は変異を検出する方法に、本プローブセットを構成するプローブをキャプチャープローブとして用いることができる。また、特開2009-232778号公報に記載の標的核酸中の変異を検出する方法に、本プローブセットを構成するプローブをキャプチャープローブとして用いることができる。さらに、特開2009-24号公報に記載の標的核酸中の変異の検出方法において、本プローブセットを構成するプローブをキャプチャープローブとして用いることができる。

[0079] なお、この種の方法において、「核酸」とは、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、全RNA、hnRNAおよび合成RNAを含む全てのDNAおよびRNAが含まれる。

[0080] なお、標的核酸とは、標的配列を有する核酸であり、標的配列とは、例えば、体質、遺伝病、癌などの特定疾患についての発症、疾患診断、治療予後、薬剤や治療の選択などのヒト、非ヒト動物などの生物における遺伝子上の指標となる塩基配列が挙げられる。典型的には、SNPなどの多型や先天的又は後天的変異が挙げられる。また、病原菌やウイルスなどの微生物由来の塩基配列も標的配列に含まれる。

実施例

[0081] 以下、本発明を実施例を挙げて具体的に説明するが、以下の実施例は本発明を説明するものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

[0082] (1) サンプル検出用DNAマイクロアレイの作製

ガラス基板(東洋鋼板社製geneslide)に、5'末端をアミノ基で修飾した

合成オリゴDNA（シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社製）を溶かした水溶液をキャプチャープローブとして、日本ガイシ株式会社製GENESHOT（登録商標）スポッターを用いてスポットした。使用した合成オリゴDNA配列は、文献（Analytical Biochemistry 364(2007)78-85）のSupplementary Table1記載のD1-1からD1-100（表10）の100種すべて（第1のプローブセット）、D1-001からD1-100のうち表11に示す52種（第2のプローブセット）及び表12に示す48種（第3のプローブセット）の3セットとして、これらのセットをそれぞれ固定化したアレイを作製した。スポットの後、80℃、1時間のベークを行った。

[0083]

[表10]

配列の種類	配列 (5'→3')	配列の種類	配列 (5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	D1-051	CGCCATTATACAACGGTTTCATGC
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG	D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTCCGAC	D1-053	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG
D1-004	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT	D1-054	GTCCGTATCGAAAAGGTACTGCA
D1-005	TAGCCAGTGATTTATGACATGC	D1-055	AGGCAGTTCAACCTATATCTGCG
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	D1-056	GGTCGTAACATTGAGAGGAGACG
D1-007	TAGCCAACTCTAAATAACGGACG	D1-057	GGCGATTTATTGCTAACTGGCTA
D1-008	TTCGGTTGTCGATATGAGGATCT	D1-058	GCACTACCGCTAACTATACGCTA
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC	D1-059	GGCTCGTAGTACTCCTTACATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA	D1-060	GGCTCTACAACTTGTGTCCATG
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG	D1-061	GGTGGAGTGAATCTCACTAGACT
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG	D1-062	CTAGCACAAATTAATCAATCCGCC
D1-013	CATTGACATAAGCTGTTGATGC	D1-063	GCAGCTGAATTGCTATGATCACC
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCATG	D1-064	GCCTATAGTGTGCGATTGTCTCG
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA	D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC
D1-016	AGGTCGGTAGTAATTTAGGTGC	D1-066	AAGAGATTTAACTTGAGCTCGCC
D1-017	TGCACTCTGATATATACAGGCCA	D1-067	TTTGTTGTTTCGATATCAGGCGTG
D1-018	GCAGCCCTTATAGATAACGGGAC	D1-068	GCCCGGAATAGATTATAACGCA
D1-019	GAAGCCATGATACTGTTCAAGGT	D1-069	GCATTTTTAGTAATCCGAGCGCC
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	D1-070	CATGGATAAGTTTTCAAGCTGCG
D1-021	CCATCAGTTATTCGGAGGGACTC	D1-071	GAGACAGGTAACCCCTCAGAGCA
D1-022	CCATATCCGATTATTAGCGACGG	D1-072	TAGCACCCGTTAAACCGAAATG
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	D1-073	TATGTTTAGTTGTTGAACCGGCG
D1-024	CCGTCGTGTTATTAAGACCCCT	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCCA
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	D1-075	AGTCAGTTAATCAGACGTGAGCA
D1-026	CATTTGTCAAGTACAGTCCACTT	D1-076	TGCAATACAATAACGTATCGCG
D1-027	GCCCACTCTTACTTATCGACT	D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA
D1-028	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG	D1-078	CGCGATAATTGATACCTACGGGC
D1-029	CGCGATTCCTATTGATTGATCCC	D1-079	GGGGTGTGAGAGCTTTTAGACG
D1-030	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG	D1-080	GGGATCCGTAAACAGTGTGTAG
D1-031	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG	D1-081	ACCACTATGATTGAGGAAACGCG
D1-032	CGCCTAAATGAACTCACTCTGC	D1-082	CGTCTTTAGTATCAACCCCTCCGC
D1-033	GGGGTCAAACCAACAATTGATCT	D1-083	GCATACGAACCTTCTATATCGGCG
D1-034	GCCCATTGATAGAATTACGAGGC	D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	D1-085	TGCTGTCTTCGTGTTTTACCTAG
D1-036	TGCCGGCTATCGTAAGTATATGC	D1-086	CGATCATGTAAAGCTAACTCGCG
D1-037	GCACCTCATACCTTCATAGAGCA	D1-087	TGCCGTCATTTAAACGTAAGGGT
D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG	D1-088	TGCAATTACAGTTGTTAACGCA
D1-039	CTAGTCCATTGTAACGAAGGCCA	D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC
D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCT	D1-090	ATGCCAATATGTACTCGTGACTC
D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA	D1-091	GCATATAGTGACGGTAAGGCGAA
D1-042	CGAGAGTCTGTAATAGCCGATGC	D1-092	GCCTCACTTGTAATAAGCGGGAC
D1-043	TGCCGTGATACTTAACCTACGCTA	D1-093	GTCCCAAAAGCTTCTTACGGACG
D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC	D1-094	CTAGGTACAACACCAACTGTCTC
D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT	D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG
D1-046	CGCCAATGACAATAAGTTGAGGC	D1-096	GGCTGGTTAAATGTAATCCGCG
D1-047	CGCGATATAACATTAAACCGAGGC	D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA
D1-048	CACGCTTAGTTCTACCTTAGGC	D1-098	AGTCGCTTAATTACTCCGGATGG
D1-049	CGCGTGAATTACTTAATCACCA	D1-099	CGCTGTTGGTATTACCTTCTCG
D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC	D1-100	TGCAGTGAAGCAACTATTGTCT

[表11]

配列の種類	配列(5'→3')	配列の種類	配列(5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG
D1-002	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATG	D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCT
D1-003	TTGCTTCGTTGTAATTTGGAC	D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA
D1-005	TAGCCCAAGTGATTTATGACATGC	D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
D1-008	TTGGTTGTGATATGAGGATCT	D1-049	CGCGTCGAATTACTTAATCACCA
D1-009	GGGGGTACTTCATACAAGATGC	D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA	D1-051	CGCCATTATACAACGGTTCATGC
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG	D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG	D1-053	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG	D1-062	CTAGCACAATTAATCAATCCGCC
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA	D1-063	GCAGCTGAATTGCTATGATCACC
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	D1-064	GCCTATAGTGTGATTGTCTCTCG
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	D1-067	TTTGTGTTTCGATATCAGGCGTG
D1-024	CCGTCTGTTATTAAAGACCCCT	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCCA
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT	D1-079	GGGGTGTGAGAGCTTTTAGACG
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT	D1-081	ACCACTATGATTGAGGAAACGCG
D1-029	CGCGATTCCATTGATTGATCCC	D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA
D1-030	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG	D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC
D1-032	CGCCTAAATGAACTCACTCTGC	D1-090	ATGCCAATATGTACTCGTGACTC
D1-033	GGGGTCAAACCAACAATTGATCT	D1-094	CTAGGTACAACACCAACTGTCTC
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG
D1-036	TGCCGGCTATCGTAAGTATATGC	D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA
D1-037	GCACCTCATACCTTCATAGAGCA	D1-100	TGCAGTGAAGCAACTATTGTCT

[0085]

[表12]

配列の種類	配列 (5'→3')	配列の種類	配列 (5'→3')
D1-004	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT	D1-061	GGTGGAGTGAATCTCACTAGACT
D1-007	TAGCCAACTCTAAATAACGGACG	D1-066	AAGAGATTTAACTTGAGCTCGCC
D1-013	CATTCGACATAAGCTGTTGATGC	D1-068	GCCCGGGAATAGATTATAACGCA
D1-017	TGCACTCTGATATATACAGGCCA	D1-069	GCATTTTATAGTAATCCGAGCGCC
D1-018	GCAGCCCTTATAGATAACGGGAC	D1-070	CATGGATAAGTTTTCAAGCTGCG
D1-019	GAAGCCATGATACTGTTTCAGGGT	D1-071	GAGACAGGTAACCCCTCAGAGCA
D1-021	CCATCAGTTATTTCGGAGGGACTC	D1-072	TAGCACCCGTAAAAACGGAAATG
D1-022	CCATATCCGATTATTAGCGACGG	D1-073	TATGTTTAGTTGTTGAACCGCG
D1-028	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG	D1-075	AGTCAGTTAATCAGACGTGAGCA
D1-031	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG	D1-076	TGGCAATACAATAACGTATCGCG
D1-034	GCCCATTGATAGAATTACGAGGC	D1-078	CGCGATAATTGATACCTACGGGC
D1-039	CTAGTCCATTGTAACGAAGGCCA	D1-080	GGGATCCGTAAACAAGTGTGTTAG
D1-042	CGAGAGTCTGTAATAGCCGATGC	D1-082	CGTCTTTAGTATCAACCCCTCCGC
D1-043	TGCCGTGATACTTAACCTACGCTA	D1-083	GCATACGAACTTCTATATCGGCG
D1-046	CGCCAATGACAATAAGTTGAGGC	D1-085	TGCTGTCTTCGTGTTTACCTAG
D1-047	CGCGATATAACATTAACCGAGGC	D1-086	CGATCATGTAAAGCTAACTCGCG
D1-048	CACGCTTAGTTCTACCTTAGGC	D1-087	TGCCGTCAATTAAACGTAAGGGT
D1-054	GTCGGTATCGAAAAGGTAAGTCA	D1-088	TGGCAATTACAGTTGTTAACGCA
D1-055	AGGCAGTTCAACCTATATCTGCG	D1-091	GCATATAGTGACGGTAAGGCGAA
D1-056	GGTCGTAACATTGAGAGGAGACG	D1-092	GCCTCACTTGTAATAAGCGGGAC
D1-057	GGCGATTATTGCTAACTGGCTA	D1-093	GTCCCAAAAGCTTCTTACGGACG
D1-058	GCACTACCGCTAACTATACGCTA	D1-096	GGCTGGTTAAATGTAATCCGCG
D1-059	GGCTCGTAGTACTCCTTACATGC	D1-098	AGTCGCTTAATTACTCCGGATGG
D1-060	GGCTCTACAACTTGTGTCCATG	D1-099	CGCTGTTGGTATTACCTTCCTCG

[0086] さらに、以下に記載した手順で、プローブの固定化を行った。すなわち、2×SSC/0.2%SDSで15分洗浄後、95℃の2×SSC/0.2%SDSで5分間洗浄し、さらに滅菌水を用いて10回以上、上下振とうさせる洗浄を3回行った後、1000rpm、3分で遠心して液切りした。

[0087] (2) DNAマイクロアレイを用いた検出

次に、3種のDNAマイクロアレイ上のプローブセットの各プローブ配列に相補な塩基配列を表13から選択し、こうした相補的塩基配列を有し、蛍光色素修飾されたサンプルDNAのセットを準備した。3種のDNAマイクロアレイに対して、対応する3種のサンプルDNAセットを用いて、ハイブリダイゼーション反応性を評価した。反応操作及びその検出手順は以下の通りとした。

[0088]

[表13]

配列の種類	配列(5'→3')	配列の種類	配列(5'→3')	配列の種類	配列(5'→3')
r01-001	GCAGATTCATGTCAGAGAACA	r01-026	AAGTGGACTGTACCTGACAAATG	r01-051	GCATGAACCGTTGTATATAGCG
r01-002	CATCTAAAGGGTCCCGAGTTCCA	r01-027	AGTCGATAGTAAGAGTGTGGCG	r01-052	GCAGTGGCTTGGTTGATATAGGC
r01-003	A	r01-028	CTAGTACGGTTACAGTAACAGCG	r01-053	CATCTATACAAGTACGACGGCG
r01-004	AGTAGGATTTCTTAGGATGCCCT	r01-029	GGGCAATCAATAGGAATCGCG	r01-054	TGCTACGCTTTTCGATACCGAC
r01-005	GCATGTCATAAATCACTGGGCTA	r01-030	CTAGCAATCTTTAAGCCGAGCGG	r01-055	CGCAGATATAGTTTGAACCTGCGT
r01-006	G	r01-031	CCATCCTGAGATTTGGACTGACT	r01-056	CGTCTCCTCTCAATGTTACGACC
r01-007	CGTCGGTTATTTAGAGTTGGCTA	r01-032	GCAGAGTGAATTTCAATTAGCGC	r01-057	TAGCCAGTTAGCAATAAATCGCC
r01-008	AGATCCTCATATCGACAACCGAA	r01-033	AGATCAATTTGTTTGGATGAGCC	r01-058	TAGGATATAGTTAGCGGTAGTGC
r01-009	GCATCTTGATGAGTACCCCGC	r01-034	GCCTCGTAATCTATCAATGGCC	r01-059	GCATGTAAAGGAGTACTACGAGCC
r01-010	TCTAGGATTTGCCCTGCTACTC	r01-035	ACCATACTCTTGACAAGGGCAT	r01-060	CATGGACACAAGTTTGTAGAGCC
r01-011	CGATGACGTAGACCTTAATAGGC	r01-036	GCATATCTTAGAGTACCGGCA	r01-061	AGTCTAGTGAGATTTCAGTCCAC
r01-012	CATTTGGTCTCACTGTATGACT	r01-037	TGCTCTATGAAGTATGAGGTGC	r01-062	GGCGATTGATTAATTGTGCTAG
r01-013	GCATCAACAGCTTATGTGGAATG	r01-038	CATCTCCTGGACTAAATGTCCGC	r01-063	GGTGAATCAGCAATTCAGGTGC
r01-014	CATGGACGTAATGTAAGTGAGCA	r01-039	TGGCTTGGTACAAATGGAGTAG	r01-064	CGAGGACAATCGACACTATAGGC
r01-015	TGCTCTACGAGTTGATAGGTGTA	r01-040	AGGGCACTGATTTCTAATTGTCT	r01-065	GGGTGACATTAATCCGTGATCG
r01-016	GCACCTAAATTAATACCGGACCT	r01-041	TGGAGCAACAATACCTCAATGC	r01-066	GGCGAGCTCAAGTTAAATCTCTT
r01-017	TGGCCTGTATATATCAGAGTGCA	r01-042	GCATGGGCTATTACAGACTCTCG	r01-067	CAGGCTGATATGGAACAACAAA
r01-018	GTCCCGTTATCTATAAGGGCTGC	r01-043	TAGGTAAGTAAAGTATCAGGCA	r01-068	TGCGTTAATCTATTTCCCGGCG
r01-019	ACCCTGAACAGTATCATGGCTTC	r01-044	GCCTCCTATATTTTGGGACTC	r01-069	GGCGCTCGGATTAATAAATGCG
r01-020	GCAGTGAATGCTGTGGTAGAATA	r01-045	AGGTTCTCCAGTTATGTGAGGC	r01-070	CGCAGCTTGAAGACTTATCCATG
r01-021	GAGTCCCTCGGAATAACTGATGG	r01-046	GCCTCAACTTATTTGATTTGGCG	r01-071	TGCTCTGAGGGTTTACCGTGTCT
r01-022	CGCTCGCTAATAATCGGATATGG	r01-047	GCCTCGGTTAAGTATATATCGCG	r01-072	CATTCCGTTTAAACGGTGTGTA
r01-023	TGGTGGGTCAATTTCTTGGAGATG	r01-048	GCCTAAGGTAGGAATAAGCGTG	r01-073	CGCCGGTTCAACACTAAACATA
r01-024	AGGGGTCTTTAATAACACGACGG	r01-049	TGGTGAATTAAGTAATTCGACGCG	r01-074	TGGGAGGGAAATAGAGCTGATCG
r01-025	ATGCCAGATAAAGCGATCCTTC	r01-050	GGCTGGAGCATATACCTATCCCG	r01-075	TGCTCAGGTCTGATTAACCTGACT
				r01-076	CGCGATACGTTATGTATTTGCCA
				r01-077	TTTGTCTGCTTTCGAAAAGTGGG
				r01-078	GCOCGTAGGTATCAATATATCGCG
				r01-079	CGTCTAAAGAGCTCTCAGACCCG
				r01-080	CTAACACACCTTGTACGGATCCG
				r01-081	CGCGTTTCTCGAATCATATAGTGGT
				r01-082	GGCGAGGGTTGATACATAAAGACG
				r01-083	CGCCGATATAGAAGTTCGTATGC
				r01-084	TGCTGTCACTACTACATACACACGG
				r01-085	CTAGGTAAAGACAGGAAGACAGCA
				r01-086	CGCGAGTTAGCTTTACATGATCG
				r01-087	ACGCTTACGTTTAAATGACGGCA
				r01-088	TGCGTTAAACAACTGTAATTGCCA
				r01-089	GAGTAGGAGGAGGTCTTCGACTC
				r01-090	GAGTCAAGGATACATATTGGCAT
				r01-091	TTCCGCTTACCGTCACTATATGC
				r01-092	GTCCCGCTTATTAAGGTGAGGC
				r01-093	CGTCCGTAAGAAGCTTTTGGGAC
				r01-094	GAGACAGTTGGTGTGTACCTAG
				r01-095	CGTCCCTTAAAGGTATAACCGGCA
				r01-096	CGCGGATTTAGATTTTAAACGAGCC
				r01-097	TAGCCCTTCTTAATAGTACCGCG
				r01-098	CCATCCGGAGTAATTAAGCGACT
				r01-099	CGAGGAAGGTAAATACCAACACGCG
				r01-100	AGACAATAGTTGCTTACACTGCA

[0089] まず、ハイブリダイゼーション用の標識済みのDNAサンプル溶液を以下のようにして調製した。

(ハイブリダイズ用標識サンプルDNA溶液の調製)

サンプルDNA溶液 9.0 μ l

ハイブリダイズ用溶液 9.0 μ l

合計 18.0 μ l

[0090] なお、サンプルDNA溶液（各2 μ M）の組成は、以下の通りとした。

Alexa555-rD1-001~100の100種（各1 mM） 各2 μ l $\times$ 100

TE 800 μ l

1000 μ l

[0091] また、ハイブリダイズ用溶液の組成は以下の通りとした。

20 $\times$ SSC 2.0 ml

10%SDS 0.8 ml

100%Formamide 12.0 ml

100 mM EDTA 0.8 ml

ミリQ水 24.4 ml

40.0 ml

[0092] DNAマイクロアレイとサンプルDNAセットとのハイブリダイゼーションは以下のようにして行った。まず、調製した標識DNAサンプル溶液を、ヒートブロック（TAITEC社DTU-N）を使用し、90℃で1分加熱した後、さらに80℃で1分加熱した。次いで、上記サンプル溶液を各9 μ lずつ、DNAマイクロアレイのスポットエリアにかけ、乾燥防止のため容器に密閉し、23℃で15秒、30秒、1分、2分、4分、15分、1時間それぞれの時間で静置にて反応させることによりハイブリダイゼーションを実施した。

[0093] 所定時間のハイブリダイゼーション後、以下の組成の洗浄液が入ったガラ

ス染色バットに、ハイブリダイゼーション後のガラス基板を浸漬し、5分間上下振とうした。その後、滅菌水を入れたガラス染色バットにガラス基板を移し、1分間上下振とうした。さらに、2000rpmで1分間遠心乾燥し、ガラス基板表面に残った水分を除去した。

[0094] (洗浄液の組成)

ミリQ水	188.0 ml
20×SSC	10.0 ml
10%SDS	2.0 ml
合計	200.0 ml

[0095] スキャナーによる蛍光検出は以下のようにして行った。すなわち、Molecular Devices GenePix4000Bを使用して適宜測定条件を調節し、蛍光画像を取得した。さらにGenePix Proを使用し、得られた画像の蛍光シグナルの数値化を行った。さらに、3種のDNAマイクロアレイによるハイブリダイゼーションにおいて、それぞれ1時間のハイブリダイゼーション後の各プローブから得られた蛍光強度を100とした時の、反応時間毎、プローブ毎の相対値（ハイブリッド形成率）をプロットした。3種のアレイについての結果を図1～図7に示す。図1～3には、100個のプローブからなる第1のプローブセットのDNAマイクロアレイについての結果を示し、図4及び図5には、52個のプローブからなる第2のプローブセットのDNAマイクロアレイについての結果を示し、図6及び図7には、48個のプローブからなる第3のプローブセットのDNAマイクロアレイについての結果を示す。

[0096] 図1～図3の結果から、反応直後（15秒）の反応性及び15分後（900秒後）の反応性に関し、プローブ間で顕著な差が見られることが確認された。

[0097] 図4及び図5に示す第2のプローブセットを固定化したアレイの結果及び図6及び図7に示す第3のプローブセットを固定化したアレイの結果が示すように、第2のプローブセットと第3のプローブセットの間においては、反応直後（15秒）の反応性及び15分後（900秒後）の反応性に関し、プ

ローブセット間で顕著な差を確認できた。第2のプローブセットを構成するプローブは、いずれも15秒以内に1時間ハイブリダイゼーション時のハイブリッド形成率の50%以上となるプローブである。さらに、15秒以内において55%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは65%以上、一層好ましくは70%以上、より一層好ましくは75%以上、さらに一層好ましくは80%以上のハイブリッド形成率のプローブを選択することで、より迅速なハイブリダイゼーションが可能となる。

[0098] 以上のことから、第2のプローブセットから選択されるプローブは、ハイブリダイゼーションを促進して迅速にハイブリダイズ産物を形成できることがわかった。すなわち、こうしたプローブセットから選択されるプローブを用いることで、ハイブリダイゼーション時のプローブ応答性(瞬時)および短時間での反応完結性の高いアレイを得ることが可能となった。

[0099] 以上の検討結果から、例えば、以下の10種のプローブが迅速性及び定量性において最も優れるプローブとして選択された。

[表14]

	配列の種類	配列 (5'→3')
1	D1-002	TGGAAC TGGGAACGCTTTAGATG
2	D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
3	D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC
4	D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
5	D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
6	D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT
7	D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCCCT
8	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
9	D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC
10	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCCA

配列表フリーテキスト

[0100] 配列番号1～200：プローブ

請求の範囲

[請求項1] 以下の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列をそれぞれ有する1種又は2種以上のプローブからなる、プローブセット。

[表15]

配列の種類	配列(5'→3')	配列の種類	配列(5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG	D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCT
D1-003	TTGCGTTCTGTTGTAATTCGGAC	D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA
D1-005	TAGCCCAAGTGATTTATGACATGC	D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
D1-008	TTGCGTTGTCGATATGAGGATCT	D1-049	CGCGTCGAATTACTTAATCACCA
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC	D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA	D1-051	CGCCATTATACAACGGTTCATGC
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG	D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG	D1-053	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG	D1-062	CTAGCACAATTAATCAATCCGCC
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA	D1-063	GCAGCTGAATTGCTATGATCACC
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	D1-064	GCCTATAGTGTGCGATTGTCTCG
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	D1-065	CGATCAGGATTAATGTCAACCC
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	D1-067	TTTGTGTTGCGATATCAGGCGTG
D1-024	COGTCGTGTTATTAAGACCCCT	D1-074	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCCA
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT	D1-079	GGGGTGTGAGAGCTTTTACAGC
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT	D1-081	ACCACTATGATTGAGGAAACGCG
D1-029	CGCGATTCTCTATTGATTGATCCC	D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA
D1-030	CGGTCTGGGTAAAGATTGCTAG	D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC
D1-032	CGCCTAAATGAACTCACTCTGC	D1-090	ATGCCAATATGTAAGTCTGACTC
D1-033	GGGGTCAAACCAACAATTGATCT	D1-094	CTAGGTACAACCAACTGTCTC
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG
D1-036	TGCCGGCTATCGTAAGTATATGC	D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA
D1-037	GCACTCATACCTTCATAGAGCA	D1-100	TGCAGTGAAGCAACTATTGTCT

[請求項2] 以下の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列をそれぞれ有する1種又は2種以上のプローブからなる、請求項1に記載のプローブセット。

[表16]

	配列の種類	配列 (5'→3')
1	D1-001	tgttctctga ccaatgaatc tgc
2	D1-002	tggaactggg aacgctttag atg
3	D1-003	ttcgcttcgt tgaatttcg gac
4	D1-005	tagcccaagt attatgaca tgc
5	D1-006	cgctctgggt actattggac gtt
6	D1-010	gagtagcagg caaataccct aga
7	D1-014	tgctcactta cattacgtcc atg
8	D1-016	aggtccggtg gtaatttagg tgc
9	D1-020	tattctacca acgacatcac tgc
10	D1-023	catctccaag aattgacca cca
11	D1-025	gaaggatcgc ttttatctgg cat
12	D1-026	catttgcag gtacagtcca ctt
13	D1-027	gcccacactc ttacttatcg act
14	D1-030	cgtctgggt taaagattgc tag
15	D1-035	atgccgttg caagattat ggt
16	D1-038	cgcgacattt agtccaggag atg
17	D1-040	agacaattag aatcagtgcc cct
18	D1-041	gcattgaggt attgttctc cca
19	D1-044	gagtcgcaa aaatatagga ggc
20	D1-045	gcctcacata actggagaaa cct
21	D1-052	gcctatatga accaagccac tgc
22	D1-062	ctagcacaat taatcaatcc gcc
23	D1-064	gcctatagtg tcgattgtcc tog
24	D1-065	cgatcacgga ttaatgtcac ccc
25	D1-074	cgatcagctc tatttccctc cca
26	D1-077	cgcatgttgc aagaacgaac aaa
27	D1-079	gggtgtgag agctttttag acg
28	D1-084	ccgtgtgtat gagtatgaca gca
29	D1-089	gagtcgaaga cctcctccta ctc
30	D1-090	atgccaatat gtactcgtga ctc
31	D1-095	tgccggttat accttaagg acg
32	D1-097	cgcggtacta ttagaaaggg cta
33	D1-100	tgcagtgtaa gcaactattg tct

[請求項3]

以下の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される1種又は2種以上の塩基配列をそれぞれ有する1種又は2種以上のプローブからなる、請求項1又は2に記載のプローブセット。

[表17]

	配列の種類	配列 (5'→3')
1	D1-001	tgttctctga ccaatgaatc tgc
2	D1-002	tggaactggg aacgctttag atg
3	D1-003	ttcgcttcgt tgtaattcg gac
4	D1-005	tagcccaagt atttatgaca tgc
5	D1-016	aggtccggtg gtaatttagg tgc
6	D1-020	tattctacca acgacatcac tgc
7	D1-023	catctccaag aattgaccca cca
8	D1-025	gaaggatcgc ttttatctgg cat
9	D1-030	ccgtctgggt taaagattgc tag
10	D1-035	atgccgttgt caagagttat ggt
11	D1-040	agacaattag aatcagtgcc cct
12	D1-041	gcattgaggt attgttgctc cca
13	D1-044	gagtccgcaa aaatatagga ggc
14	D1-045	gcctcacata actggagaaa cct
15	D1-062	ctagcacaaat taatcaatcc gcc
16	D1-064	gcctatagtg tcgattgtcc tgc
17	D1-065	cgatcacgga ttaatgtcac ccc
18	D1-074	cgatcagctc tattccctc cca
19	D1-084	ccgtgtgtat gattatgaca gca
20	D1-089	gagtgaaga cctcctccta ctc
21	D1-097	cgcggtacta ttagaaaggg cta

[請求項4] 請求項1に記載の表に記載の塩基配列又はその相補配列からなる群から選択される10種以上の塩基配列を有する10種以上のプローブからなる、請求項3に記載のプローブセット。

[請求項5] 少なくとも以下の表に記載の塩基配列又は相補配列を有するプローブを含む、請求項4に記載のプローブセット。

[表18]

	配列の種類	配列 (5'→3')
1	D1-002	TGGAAC TGGGAACGCTTTAGATG
2	D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
3	D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC
4	D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
5	D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
6	D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT
7	D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCT
8	D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
9	D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC
10	D1-074	CGATCAGCTCTATTCCCTCCCA

[請求項6] 請求項1～5のいずれかに記載のプローブセットが担体に固定化されたアレイ。

[請求項7] 請求項1～5のいずれかに記載のプローブセットを用いてハイブリダイゼーションを実施するハイブリダイゼーション工程と、

前記ハイブリダイゼーション工程のハイブリダイズ産物を検出する
検出工程と、

を備える、プローブセットの使用方法。

[請求項8]

プローブのスクリーニング方法であって、

融解温度が57℃以上61℃以下であり、23塩基長の正規直交配
列である塩基配列を有するプローブについて、前記塩基配列と相補的
な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションを
実施するハイブリダイゼーション工程と、

前記ハイブリダイゼーション工程において、所定時間内におけるハ
イブリッド形成率が所定数値以上のプローブを選択する工程と、
を備える、スクリーニング方法。

[請求項9]

プローブのスクリーニング方法であって、

融解温度が57℃以上61℃以下であり、23塩基長の正規直交配
列である塩基配列を有するプローブについて、前記塩基配列と相補的
な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションを
実施するハイブリダイゼーション工程と、

前記ハイブリダイゼーション工程において、所定時間内におけるハ
イブリッド形成率が所定数値範囲内のプローブを選択する工程と、
を備える、スクリーニング方法。

[請求項10]

プローブセットであって、

以下の(a)及び(b)を充足する、プローブからなる、セット。

(a) 融解温度が57℃以上61℃以下であり、23塩基長の正規直
交配列である塩基配列を有する。

(b) ハイブリダイゼーション開始後3600秒後におけるハイブリ
ッド形成率に対する

ハイブリダイゼーション開始後15秒後のハイブリッド形成率が50
%以上である。

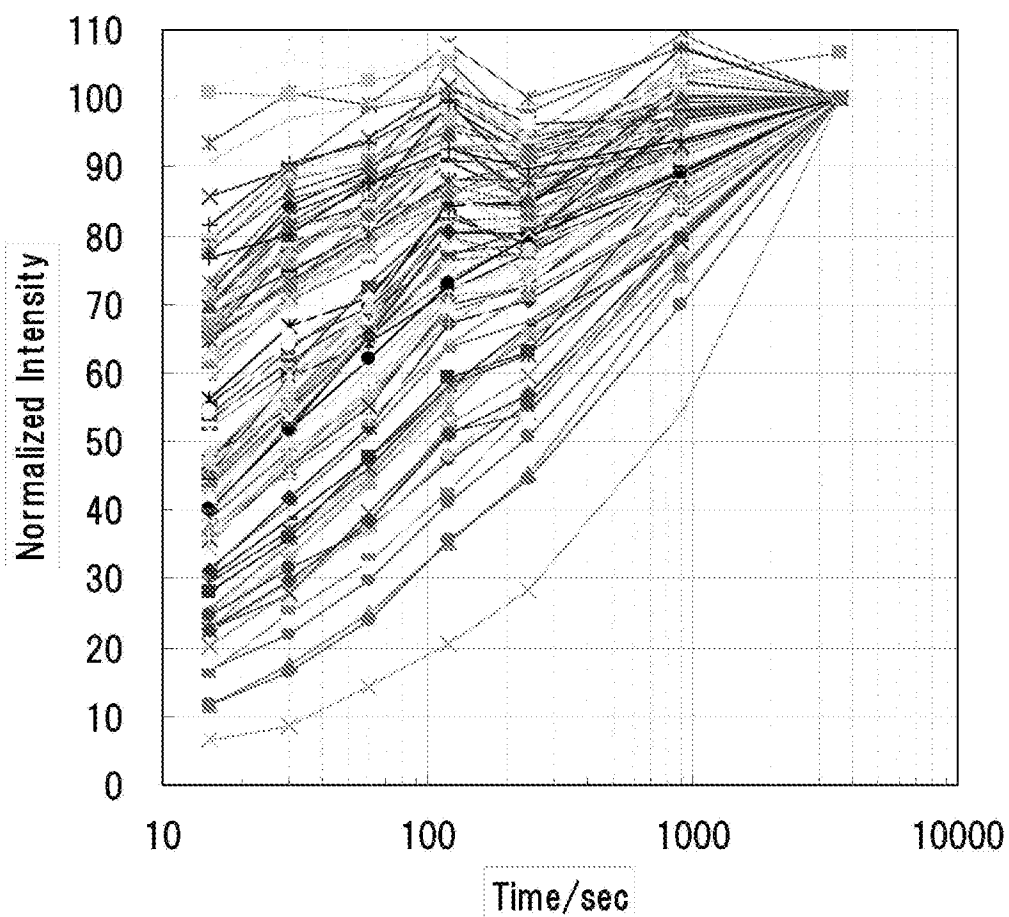
[図1]

	15秒	30秒	60秒	120秒	240秒	900秒	3600秒
D1-001	72	84	89	99	91	99	100
D1-002	78	88	91	101	94	102	100
D1-003	70	82	85	90	92	99	100
D1-004	46	61	68	80	83	92	100
D1-005	70	81	85	93	86	98	100
D1-006	66	79	82	93	86	97	100
D1-007	39	49	56	69	73	88	100
D1-008	55	64	70	80	81	89	100
D1-009	61	70	79	85	88	93	100
D1-010	67	78	82	91	92	98	100
D1-011	62	72	76	90	86	99	100
D1-012	62	73	78	89	87	96	100
D1-013	34	48	58	72	76	95	100
D1-014	67	81	83	93	92	104	100
D1-015	64	74	79	87	85	95	100
D1-016	82	89	90	98	92	97	100
D1-017	32	41	51	64	68	83	100
D1-018	24	33	43	57	65	84	100
D1-019	43	54	64	76	77	89	100
D1-020	79	89	93	98	95	99	100
D1-021	36	46	56	71	72	92	100
D1-022	20	28	38	52	60	84	100
D1-023	94	101	99	108	100	107	100
D1-024	61	75	79	88	88	102	100
D1-025	82	91	94	100	93	100	100
D1-026	65	73	80	85	86	93	100
D1-027	69	75	81	91	85	92	100
D1-028	31	42	52	67	71	84	100
D1-029	54	63	72	82	83	86	100
D1-030	78	86	90	95	93	97	100
D1-031	36	46	55	70	73	89	100
D1-032	56	67	71	84	85	97	100
D1-033	54	64	76	83	91	100	100
D1-034	41	54	65	74	80	93	100
D1-035	91	97	99	102	94	102	100
D1-036	53	62	69	78	79	88	100
D1-037	52	65	71	79	81	87	100
D1-038	67	78	83	93	92	103	107
D1-039	24	33	45	59	66	84	100
D1-040	86	90	94	102	96	97	100
D1-041	73	81	87	97	92	99	100
D1-042	47	59	69	85	84	102	100
D1-043	44	56	68	82	83	98	100
D1-044	72	83	88	91	91	99	100
D1-045	79	90	99	101	98	107	100
D1-046	24	36	46	56	66	87	100
D1-047	16	25	32	43	55	76	100
D1-048	23	33	44	55	66	85	100
D1-049	63	71	80	88	90	92	100
D1-050	63	73	81	87	89	96	100
D1-051	54	65	77	92	90	103	100
D1-052	65	78	85	99	88	107	100
D1-053	59	71	79	94	85	104	100
D1-054	44	54	65	77	77	96	100
D1-055	48	59	66	75	81	98	100
D1-056	45	59	64	72	77	88	100
D1-057	37	45	54	64	72	84	100
D1-058	41	54	65	75	79	89	100
D1-059	40	50	60	72	75	89	100
D1-060	25	31	37	47	56	79	100
D1-061	48	55	67	83	79	102	100
D1-062	73	85	89	106	94	109	100
D1-063	52	60	73	84	77	98	100
D1-064	72	77	84	97	86	105	100
D1-065	102	105	104	107	96	102	100
D1-066	42	52	59	70	77	91	100
D1-067	52	60	67	78	79	88	100
D1-068	47	56	66	81	81	90	100
D1-069	22	29	37	48	57	77	100
D1-070	37	47	58	67	74	87	100
D1-071	46	57	70	86	81	101	100
D1-072	45	56	66	80	77	98	100

[図2]

	15秒	30秒	60秒	120秒	240秒	900秒	3600秒
D1-073	47	55	66	80	75	93	100
D1-074	101	100	102	105	89	101	100
D1-075	48	58	70	81	78	92	100
D1-076	6	9	14	21	29	54	100
D1-077	68	72	79	87	84	87	100
D1-078	17	22	30	41	51	75	100
D1-079	66	72	80	86	89	92	100
D1-080	30	39	48	58	67	79	100
D1-081	61	71	76	85	84	94	100
D1-082	40	52	65	80	80	96	100
D1-083	28	36	47	59	63	89	100
D1-084	70	82	89	94	85	100	100
D1-085	23	28	40	51	54	79	100
D1-086	30	37	46	58	63	81	100
D1-087	40	52	62	73	80	89	100
D1-088	36	45	53	65	73	84	100
D1-089	70	76	86	93	94	99	100
D1-090	68	78	84	93	94	95	100
D1-091	23	30	39	51	57	80	100
D1-092	18	24	32	44	53	82	100
D1-093	12	18	25	35	45	74	100
D1-094	63	71	80	86	80	92	100
D1-095	65	73	80	88	88	93	100
D1-096	12	17	24	36	45	70	100
D1-097	77	80	88	93	90	94	100
D1-098	26	35	45	58	65	81	100
D1-099	40	53	65	77	81	90	100
D1-100	65	73	83	86	91	96	100

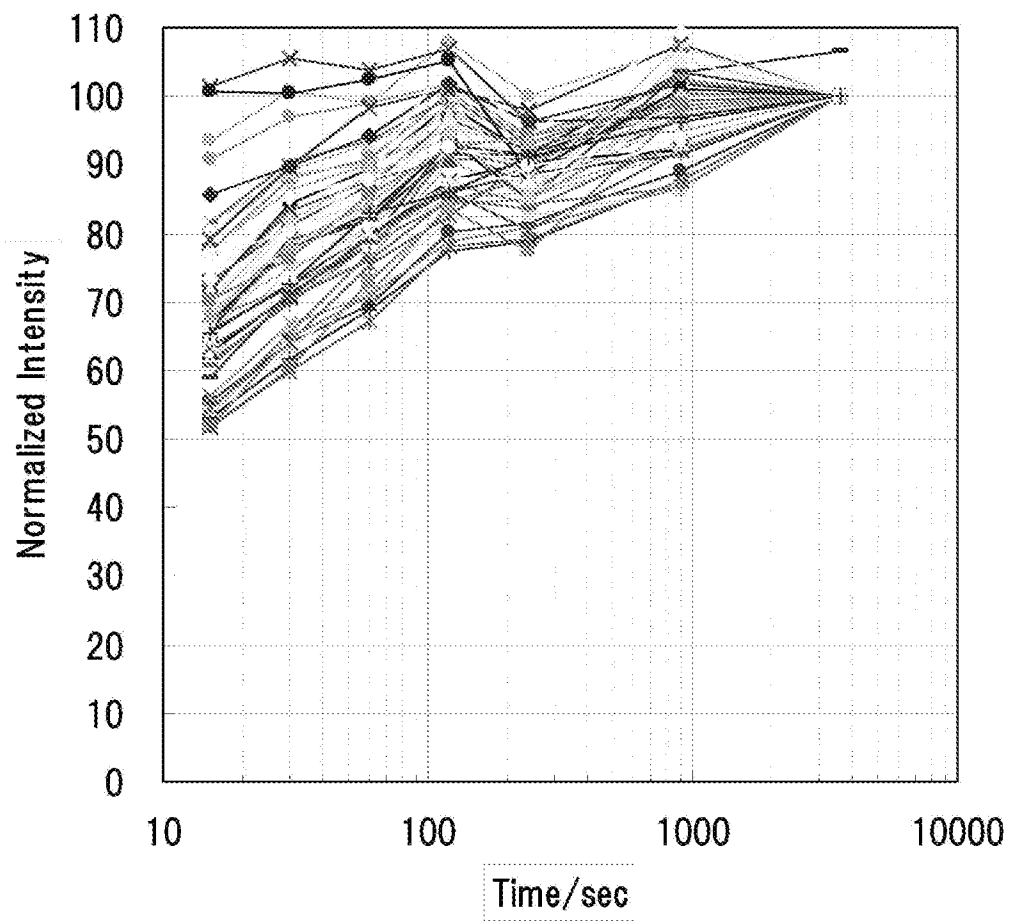
[図3]



[図4]

	15秒	30秒	60秒	120秒	240秒	900秒	3600秒
D1-004	46	61	68	80	83	92	100
D1-007	39	49	56	69	73	88	100
D1-013	34	48	58	72	76	95	100
D1-017	32	41	51	64	68	83	100
D1-018	24	33	43	57	65	84	100
D1-019	43	54	64	76	77	89	100
D1-021	36	46	56	71	72	92	100
D1-022	20	28	38	52	60	84	100
D1-028	31	42	52	67	71	84	100
D1-031	36	46	55	70	73	89	100
D1-034	41	54	65	74	80	93	100
D1-039	24	33	45	59	66	84	100
D1-042	47	59	69	85	84	102	100
D1-043	44	56	68	82	83	98	100
D1-046	24	36	46	56	66	87	100
D1-047	16	25	32	43	55	76	100
D1-048	23	33	44	55	66	85	100
D1-054	44	54	65	77	77	96	100
D1-055	48	59	66	75	81	98	100
D1-056	45	59	64	72	77	88	100
D1-057	37	45	54	64	72	84	100
D1-058	41	54	65	75	79	89	100
D1-059	40	50	60	72	75	89	100
D1-060	25	31	37	47	56	79	100
D1-061	48	55	67	83	79	102	100
D1-066	42	52	59	70	77	91	100
D1-068	47	56	66	81	81	90	100
D1-069	22	29	37	48	57	77	100
D1-070	37	47	58	67	74	87	100
D1-071	46	57	70	86	81	101	100
D1-072	45	56	66	80	77	98	100
D1-073	47	55	66	80	75	93	100
D1-075	48	58	70	81	78	92	100
D1-076	6	9	14	21	29	54	100
D1-078	17	22	30	41	51	75	100
D1-080	30	39	48	58	67	79	100
D1-082	40	52	65	80	80	96	100
D1-083	28	36	47	59	63	89	100
D1-085	23	28	40	51	54	79	100
D1-086	30	37	46	58	63	81	100
D1-087	40	52	62	73	80	89	100
D1-088	36	45	53	65	73	84	100
D1-091	23	30	39	51	57	80	100
D1-092	18	24	32	44	53	82	100
D1-093	12	18	25	35	45	74	100
D1-096	12	17	24	36	45	70	100
D1-098	26	35	45	58	65	81	100
D1-099	40	53	65	77	81	90	100

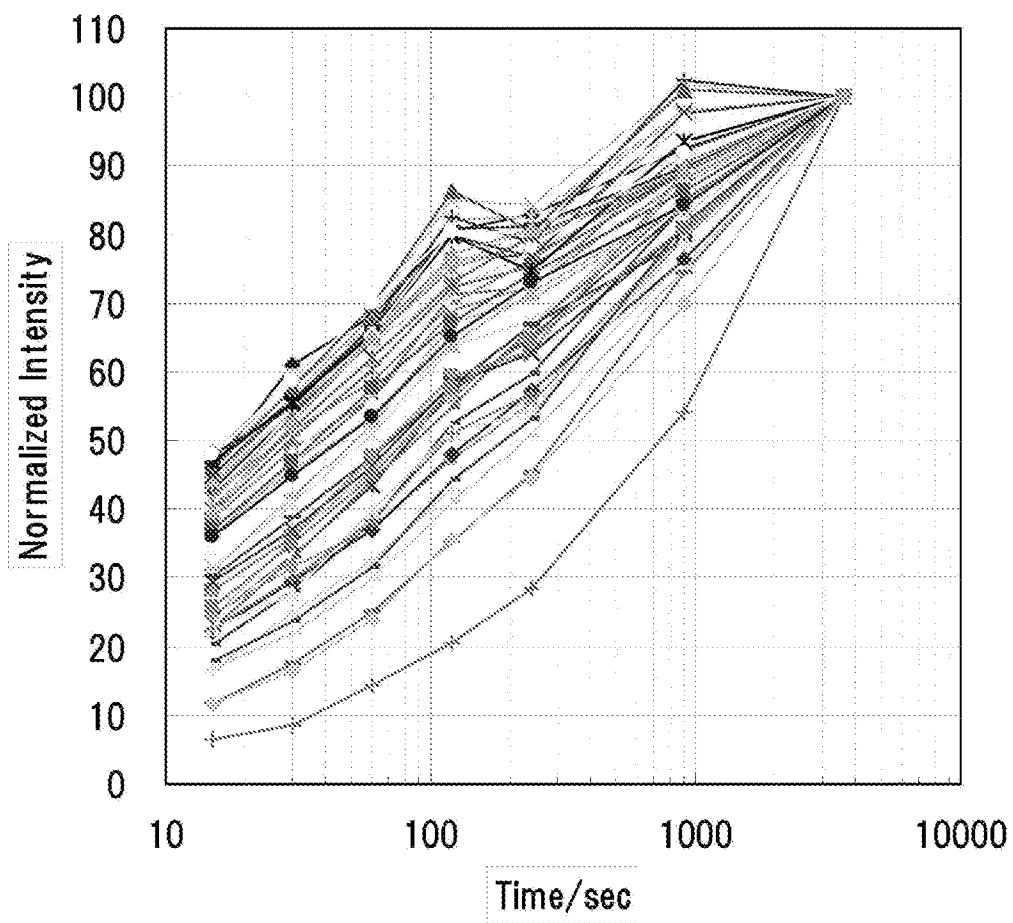
[図5]



[図6]

	15秒	30秒	60秒	120秒	240秒	900秒	3600秒
D1-004	46	61	68	80	83	92	100
D1-007	39	49	56	69	73	88	100
D1-013	34	48	58	72	76	95	100
D1-017	32	41	51	64	68	83	100
D1-018	24	33	43	57	65	84	100
D1-019	43	54	64	76	77	89	100
D1-021	36	46	56	71	72	92	100
D1-022	20	28	38	52	60	84	100
D1-028	31	42	52	67	71	84	100
D1-031	36	46	55	70	73	89	100
D1-034	41	54	65	74	80	93	100
D1-039	24	33	45	59	66	84	100
D1-042	47	59	69	85	84	102	100
D1-043	44	56	68	82	83	98	100
D1-046	24	36	46	56	66	87	100
D1-047	16	25	32	43	55	76	100
D1-048	23	33	44	55	66	85	100
D1-054	44	54	65	77	77	96	100
D1-055	48	59	66	75	81	98	100
D1-056	45	59	64	72	77	88	100
D1-057	37	45	54	64	72	84	100
D1-058	41	54	65	75	79	89	100
D1-059	40	50	60	72	75	89	100
D1-060	25	31	37	47	56	79	100
D1-061	48	55	67	83	79	102	100
D1-066	42	52	59	70	77	91	100
D1-068	47	56	66	81	81	90	100
D1-069	22	29	37	48	57	77	100
D1-070	37	47	58	67	74	87	100
D1-071	46	57	70	86	81	101	100
D1-072	45	56	66	80	77	98	100
D1-073	47	55	66	80	75	93	100
D1-075	48	58	70	81	78	92	100
D1-076	6	9	14	21	29	54	100
D1-078	17	22	30	41	51	75	100
D1-080	30	39	48	58	67	79	100
D1-082	40	52	65	80	80	96	100
D1-083	28	36	47	59	63	89	100
D1-085	23	28	40	51	54	79	100
D1-086	30	37	46	58	63	81	100
D1-087	40	52	62	73	80	89	100
D1-088	36	45	53	65	73	84	100
D1-091	23	30	39	51	57	80	100
D1-092	18	24	32	44	53	82	100
D1-093	12	18	25	35	45	74	100
D1-096	12	17	24	36	45	70	100
D1-098	26	35	45	58	65	81	100
D1-099	40	53	65	77	81	90	100

[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/064471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NISHIDA Nao, et al., Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay., Analytical biochemistry, 2007, Vol.364, No.1, pages 78-85	1-10
A	NISHIDA Nao, et al., DigiTag assay for multiplex single nucleotide polymorphism typing with high success rate., Analytical biochemistry, 2005, Vol.346, No.2, pages 281-288	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August, 2012 (22.08.12)

Date of mailing of the international search report

04 September, 2012 (04.09.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	NISHIDA Nao, et al., Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay., Analytical biochemistry, 2007, Vol.364, No.1, pages 78-85	1-10
A	NISHIDA Nao, et al., DigiTag assay for multiplex single nucleotide polymorphism typing with high success rate., Analytical biochemistry, 2005, Vol.346, No.2, pages 281-288	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 2 . 0 8 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 4 . 0 9 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

清水 晋治

4 B

3 5 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8